

DT

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :

2 329 294

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

②①

N° 76 32587

⑤④ Nouveaux octapeptides et procédés pour leur production.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.²). A 61 K 37/02; C 07 C 103/52.

②② Date de dépôt 28 octobre 1976, à 15 h 27 mn.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le
29 octobre 1975, n. 626.909 aux noms de Eugene Leroy Wittle, Mildred Catherine
Rebstock, Ernest D. Nicolaides et Alfred Campbell.*

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 21 du 27-5-1977.

⑦① Déposant : PARKE, DAVIS & COMPANY, résidant aux Etats-Unis d'Amérique.

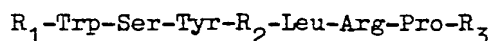
⑦② Invention de :

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Regimbeau, Corre, Paillet, Martin et Schrimpf.

La présente invention concerne de nouveaux peptides qui sont utiles comme antagonistes au "facteur de libération de l'hormone lutéinisante" (LRF) et des procédés pour leur production.

Plus particulièrement, l'invention concerne de nouveaux octapeptides qui sont représentés par la formule



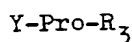
et leurs sels, où R_1 est Z-Gln, Z-Gln (bz1), Bhoc-Gln, Boc-His (bz1), Z-His (bz1), Boc-Ser (bz1), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bz1), Z-Ile, Boc-Cys (bz1), Z-Phe ou Z-Ser (bz1), R_2 est D-Phe, D-Ala, D-Leu, D-Trp, D-Tyr, D-Tyr (Me), D-Ser, D-Met, D-Arg, D-Val, D-His, D-Gln, D-Phe, D-Thr, D-Pro ou D-Asn et R_3 est NH_2 , NH (alcoyl inférieur), N (alcoyl inférieur)₂, NH-benzyle, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (alcoyl inférieur)₂ ou $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH}$ -benzyle; et certains produits intermédiaires peptides et leurs sels utilisés dans la préparation de ces composés. Dans la formule I, on utilise les symboles classiques pour les résidus amino-acides des peptides et les groupes protecteurs liés à eux et chacun doit être considéré comme ayant la signification suivante : Trp, L-tryptophyle; Ser, L-séryle; Tyr, L-tyrosyle; Leu, L-leucyle; Arg, L-arginyle; Pro, L-propyle; Z-Gln, N^α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyle; Z-Gln (bz1), N^α -benzyl- N^α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyle; Bhoc-Gln, N^α -benzhydryloxycarbonyl-L-glutaminyle; Boc-His (bz1), N^α -butoxycarbonyl- N^{im} -benzyl-L-histidyle; Z-His (bz1), N^α -benzyloxycarbonyl- N^{im} -benzyl-L-histidyle; Boc-Ser (bz1), O-benzyl- N^α -t-butoxycarbonyl-L-séryle; Boc-Pro, N^α -t-butoxycarbonyl-L-propyle; Z-Leu, N^α -benzyloxycarbonyl-L-leucyle; Boc-Leu, N^α -t-butoxycarbonyl-L-leucyle; Z-Tyr (bz1), O-benzyl- N^α -benzyloxycarbonyl-L-tyrosyle; Z-Ile, N^α -benzyloxycarbonyl-L-isoleucyle; Boc-Cys (bz1), S-benzyl- N^α -t-butoxycarbonyl-L-cystéinyle; Z-Phe, N^α -benzyloxycarbonyl-L-phénylalanyle; Z-Ser (bz1), O-benzyl- N^α -benzyloxycarbonyl-L-Séryle; D-Phe, D-phénylalanyle; D-Ala, D-alanyle; D-alanyle; D-Leu, D-leucyle; D-Trp, D-tryptophyle; D-Tyr, D-tyrosyle; D-Tyr (Me); O-méthyl-D-tyrosyle; D-Ser, D-séryle; D-Met, D-méthionyle; D-Arg, D-arginyle, D-Val, D-valyle; D-His, D-histidyle; D-Gln, D-glutaminyle; D-Phe, D-phénylseryl (érythro ou thréo); D-Thr, D-thréonyle; D-pro, D-prolyle; et D-Asn; D-asparaginyle. De plus, l'expression "alcoyle inférieur" doit être comprise comme désignant une portion d'hydrocarbure saturé à chaîne droite, ramifiée ou cyclique ayant jusqu'à six atomes de carbone, telle que méthyle, éthyle, isopropyle et cyclopropyle. Les symboles utilisés dans la formule I seront utilisés aussi dans les formules qui suivent pour d'autres composés et chacun de ces symboles devra être compris comme ayant la signification indiquée ci-dessus.

Selon la présente invention, des composés de la formule I et leurs sels d'addition d'acide sont produits en faisant réagir un azide, représenté par la formule



II

avec un composé de la formule



III

dans un milieu de solvant non-réactif, de préférence du diméthylformamide ou un mélange diméthylformamide-tétrahydrofuranne, où X est $R_1-Trp-Ser-Tyr$, $R_1-Trp-Ser-Tyr-R_2$ ou $R_1-Trp-Ser-Tyr-R_2-Leu$, Y est Arg, Leu-Arg et R_2 et R_3 sont tels que définis précédemment. Les composés des formules II et III sont choisis pour réaction de manière que le produit résultant soit un octapeptide de formule I.

L'azide de la formule II est préparé et utilisé in situ tandis que le composé de formule III est utilisé avec le groupe Arg sous la forme d'un sel d'addition d'acide d'un acide fort, comme le chlorhydrate ou le trifluoroacétate. Les deux constituants, II et III, sont généralement mis à réagir en quantités approximativement équimolaires à des températures comprises entre $-30^{\circ}C$ environ et $30^{\circ}C$ environ pendant seize à cinquante heures, mais des températures comprises entre $30^{\circ}C$ et $50^{\circ}C$ peuvent être utilisées avec une période de réaction raccourcie.

Les composés de formule I sont de préférence isolés sous la forme d'un sel d'addition d'acide, mais peuvent être, si on le désire, isolés sous la forme d'une base libre.

Les composés peptide-azide que l'on utilise comme corps en réaction dans le procédé précédent sont normalement préparés in situ en faisant réagir un peptide-hydrazide représenté par la formule



IV

où X est tel que décrit précédemment, avec un nitrite d'alcoyle inférieur, de préférence du nitrite d'isoamyle, en présence d'un acide dans un milieu de solvant inerte comme du diméthylformamide et l'azide résultant est mis à réagir ensuite comme décrit ci-dessus sans isolement. L'acide préféré pour utilisation dans la préparation de l'azide est une solution d'acide chlorhydrique dans du diméthylformamide ou du tétrahydrofuranne; on utilise entre

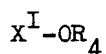
3 et 6 équivalents d'acide pour chaque équivalent de l'hydrazide de formule IV. La préparation de l'azide est effectuée à une température comprise entre -60° et 10°C. Après la formation in situ de l'azide de formule II et avant la réaction ultérieure du peptide-azide avec le composé de formule III pour former le produit octapeptide I, une amine tertiaire comme la triéthylamine est ajoutée au mélange de réaction pour neutraliser l'acide utilisé. Ces azides font aussi partie de l'invention.

Les peptide-hydrazides de formule IV ci-dessus sont préparés par divers procédés. Certains de ces composés peuvent exister sous la forme de sels d'addition d'acide, comme les sels chlorhydrate, sulfate, acétate, citrate, trifluoroacétate, etc, et ces sels sont inclus dans l'invention. L'hydrazide de la formule IV, où X est tel que décrit précédemment, est préparé en faisant réagir un ester de la formule



où X est tel que défini précédemment et R_4 est un groupe alcoyle inférieur, de préférence méthyle, avec un excès d'hydrazine (1:1,1 à 100) de préférence sous la forme de son hydrate, dans un solvant organique, comme du diméthylformamide, du méthanol, de l'éthanol, etc. La réaction est généralement conduite à la température ambiante, mais des températures comprises entre 5°C et 100°C peuvent être utilisées pendant des périodes comprises entre 30 minutes environ et 200 heures environ, de préférence pendant 72 heures environ.

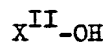
Les esters de formule V sont préparés en faisant réagir un composé de la formule



25

VI

dans laquelle R_4 est tel que défini précédemment et X^{I} est Trp-Ser-Tyr, R_2 -Leu, Trp-Ser-Tyr- R_2 , Trp-Ser-Tyr- R_2 -Leu ou Leu où R_2 est tel que défini précédemment ou un sel d'un composé VI du moment qu'un centre basique est présent dans R_2 , avec un composé ayant la formule



30

VII

où X^{II} est R_1 , R_1 -Trp-Ser-Tyr ou R_1 -Trp-Ser-Tyr- R_2 dans un solvant organique, comme du diméthylformamide. Cette réaction de couplage peut être effectuée d'un certain nombre de manières. Initialement elle peut être conduite à une température de -10°C environ pendant deux heures, suivies d'environ 24 heures à la température ambiante, en utilisant le composé VII sous la forme de son ester de pentachlorophényle et de la triéthylamine. Une deuxième techni-

que utilise aussi du diméthylformamide comme solvant et une température de -10°C à 0°C pendant les trois premières heures, avec ensuite deux jours à la température ambiante, en faisant appel à du 1-hydroxybenztriazole et à du dicyclohexylcarbodiimide pour favoriser la réaction. Une troisième technique

5 comporte la transformation du composé de formule VII en son ester de méthyle par des réactions normales d'estérification, ou l'ester peut être obtenu directement par synthèse comme décrit dans un exemple ci-après.

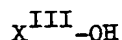
L'ester de méthyle est ensuite transformé en l'hydrazide correspondant conformément au mode opératoire indiqué pour préparer les hydrazides de la formule IV et cette matière est transformée en l'azide correspondant en utilisant le mode opératoire décrit pour la préparation de composée de la

10 formule II et couplé avec un composé de la formule VI conformément aux techniques de couplage des azides décrites précédemment.

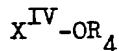
En utilisant les techniques générales ci-dessus dans l'ordre approprié, on peut édifier l'un quelconque des esters désirés de la formule V.

15

Les esters de la formule VI qui ne sont pas déjà rapportés dans la documentation technique publiée sont préparés par le même procédé qu'indiqué pour la préparation des composés de la formule V, selon lequel un composé de la formule



est combiné avec un composé de la formule



où X^{III} est Trp, R_2 ou Trp-Ser-Tyr, le groupe amino terminal est protégé par un groupe benzyloxycarbonyle, benzhydryloxycarbonyle ou t-butoxycarbonyle,

25 X^{IV} est R_2 , Leu, R_2 -Leu, Ser-Tyr ou Ser-Tyr- R_2 -Leu et R_4 est tel que défini précédemment, après quoi on élimine le groupe benzyloxycarbonyle ou benzhydryloxycarbonyle en dissolvant le produit dans du méthanol et on effectue ensuite un traitement avec un catalyseur palladium-sur-charbon en présence d'hydrogène

30 moléculaire pendant une période d'environ deux heures et demie à la température ambiante ou on élimine le groupe t-butoxycarbonyle par décomposition acide douce en utilisant un acide aqueux dilué, comme de l'acide chlorhydrique ou de l'acide trifluoroacétique.

Tous les composés de formule $X^{III}-OH$ sont des composés connus dans une forme non-protégée à l'exception de Trp-Ser-Tyr-OH. Bien que la plupart des composés protégés soient connus aussi, ceux qui n'apparaissent pas dans la

35 documentation technique publiée sont préparés en faisant réagir du chlorure

de carbobenzoxy ou du chlorure de benzhydryloxy-carbonyl avec l'acide-amino approprié en présence d'une base conformément aux procédés généraux utilisés dans la chimie des peptides pour introduire des groupes protecteurs ou en faisant réagir du t-butoxycarbonylazide avec l'acide-amino approprié conformément au procédé décrit dans le texte : Solid Phase Peptide Synthesis, J. M. Stewart et J. D. Young, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1969), p. 28. Le tripeptide protégé est de préférence obtenu par les techniques de couplage décrites plus haut en utilisant du tryptophane protégé avec Ser-Tyr-OR₄, où R₄ est tel que défini précédemment. Le Ser-Tyr-OR₄ est obtenu en éliminant le groupe protecteur du dérivé carbobenzoxy de Ser-Tyr-OR₄ en utilisant les techniques normales décrites plus haut.

Le composé de la formule X^{IV}-OR₄ où X^{IV} est Leu est rapporté dans la documentation technique publiée et le procédé pour préparer X^{IV}-OR₄ où X^{IV} est Ser-Tyr est indiqué immédiatement ci-dessus. Quand X^{IV} est Ser-Tyr-R₂-Leu, le composé X^{IV}-OH est préparé en couplant Ser-Tyr-OH protégé avec R₂-Leu-OR₄, où R₂ et R₄ sont tels que définis précédemment, en utilisant le procédé décrit plus haut employant un produit intermédiaire azide ou en couplant les deux fragments à l'aide de dicyclohexylcarbodiimide dans un solvant non-polaire à la température ambiante jusqu'à ce que la précipitation de dicyclohexyl urée soit complète, avec ensuite élimination du groupe protecteur en utilisant les techniques décrites précédemment à cet effet. On prépare les composés de la formule R₂-Leu-OR₄ en couplant le composé connu protégé R₂-OH avec Leu-OR₄ connu en utilisant les techniques à l'azide ou au dicyclohexylcarbodiimide décrites ci-dessus et les techniques d'élimination des groupes protecteurs décrites précédemment. Quand X^{IV} est R₂, on utilise des techniques normales d'estérification.

Les composés de la formule VII qui ne sont pas déjà rapportés dans la documentation technique publiée ou décrits dans une autre partie de la présente description sont préparés en utilisant sensiblement le même procédé qu'indiqué pour la préparation des composés de la formule V. Un composé de la formule

$$X^V - OH$$

est combiné avec un composé de la formule

$$X^{VI} - OR_4$$

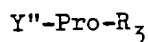
où X^V est R₁-Trp-Ser-Tyr et X^{VI} est R₂ en utilisant le procédé décrit pour la préparation de composés de la formule V. L'hydrolyse des esters résultants en utilisant un alcali dilué en quantités seulement légèrement supérieures à

la quantité équimolaire donne l'acide libre de formule VII, ou l'ester peut être utilisé en employant les procédés à l'hydrazide et à l'azide comme décrit ailleurs pour préparer directement le composé de formule VII.

Les composés de la formule $X^{II}OH$ dans lesquels X^{II} est R_1 sont tous connus, à l'exception de Bhoc-Gln qui est préparé à partir de benzhydryloxycarbonyl hydrazide, de nitrite de sodium et de L-glutamine en utilisant de l'acide acétique aqueux comme solvant et une température de 5°C. Les composés de la formule $X^V OH$ dans lesquels X^V est R_1 -Trp-Ser-Tyr sont préparés en faisant réagir un composé R_1-OH connu avec le tripeptide Trp-Ser-Tyr-OR₄ conformément au procédé décrit pour la préparation de composés de la formule V, avec ensuite hydrolyse de l'ester, ou l'ester peut être utilisé en passant par le procédé de couplage à l'hydrazide et à l'azide comme décrit ailleurs pour préparer directement le composé de formule VII.

Les composés de la formule $X^{VI} OR_4$ sont préparés à partir de D-amino acides connus par des techniques normales d'estérification.

Les composés de formule III et leurs sels d'addition d'acide, comme les sels chlorhydrate, sulfate, acétate, citrate, trifluoroacétate, benzoate, etc, sont préparés par divers procédés. Les nouveaux composés de formule III et leurs sels d'addition d'acide, qui font aussi partie de l'invention, sont ceux dans lesquels Y est Y' et Y' est défini comme R_2 -Leu-Arg. Les composés de la formule III et leurs sels d'addition d'acide dans lesquels Y, R_2 et R_3 sont tels que décrits précédemment sont préparés en éliminant le groupe protecteur par réduction ou en éliminant un groupe protecteur par décomposition acide à partir d'un composé de la formule

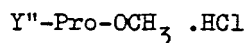


VIII

de préférence sous la forme de son sel d'addition d'acide, où R_3 est tel que défini précédemment et Y'' est Arg, Leu-Arg ou de préférence R_2 -Leu-Arg, où le groupe amino terminal est protégé par un groupe qui est facilement éliminé par réduction, comme un groupe benzyloxycarbonyle ou benzhydryloxycarbonyle, le composé étant dissous dans un solvant tel qu'un alcool alcylique inférieur, de préférence du méthanol, en utilisant un catalyseur métal noble comme du palladium-sur-carbone en présence d'hydrogène moléculaire ou par clivage quand le groupe protecteur est facilement éliminé par décomposition acide comme le groupe t-butoxycarbonyle en utilisant un acide comme l'acide trifluoroacétique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, etc, dans un système de solvant approprié comme du dioxane, du dichlorométhane,

de l'acide acétique, etc. Les réactions de réduction ou de décomposition acide sont conduites entre 10°C environ et 50°C environ, de préférence à la température ambiante, pendant des périodes allant de quelques minutes à huit heures environ, de préférence pendant 15 minutes environ pour la réaction de décomposition acide. Le pH peut être réglé de manière à transformer le composé en sa base libre.

Les sels des composés de formule VIII sont préparés à partir des esters de méthyle de la formule



10

IX

où Y'' est tel que décrit précédemment, que l'on fait réagir avec un composé choisi parmi l'ammoniac, une alcoylamine inférieure ou une di(alcoyl inférieur) amine. Les réactions sont conduites à des températures comprises entre 5°C environ et 60°C environ pendant une période comprise entre quelques heures et dix jours environ. Quand on utilise des amines très volatiles, la réaction est conduite dans un appareil fermé tenant la pression.

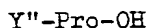
Il est avantageux aussi quelquefois quand R_3H est moins réactif de préparer des composés de formule III à partir de P-Pro- R_3 (IIIa) où P est un groupe protecteur approprié tel que benzyloxycarbonyle ou t-butyloxycarbonyle. Après l'élimination du groupe protecteur de P-Pro- R_3 par les procédés décrits ci-dessus, le Pro- R_3 résultant peut être ensuite combiné avec Y''-OH par des techniques normales de la chimie des peptides comme avec du dicyclohexylcarbodiimide dans du t-butanol. L'élimination du groupe protecteur du Y''-Pro- R_3 résultant donne alors le composé désiré de la formule III (Y-Pro- R_3).

La préparation de P-Pro- R_3 peut être effectuée par divers procédés comprenant la réaction de R_3H avec P-Pro-OH après que ce dernier composé a été transformé en un produit intermédiaire activé au moyen de dicyclohexylcarbodiimide, de dicyclohexylcarbodiimide en combinaison avec du pentachlorophénol, avec du diphénylphosphoryl azide (Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 22, 859-63, 1975) ou par le procédé à l'anhydride mixte.

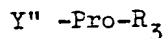
Les composés de la formule IX sont préparés à partir de Pro-OCH₃. HCl connu qui est combiné avec Arg-OH protégé, Leu-Arg-OH protégé ou R₂-Leu-Arg-OH protégé conformément au procédé indiqué pour la préparation de composés de la formule V. Un deuxième procédé pour préparer certains composés de la formule IX fait intervenir la combinaison de Arg-Pro-OCH₃.HCl avec des composés connus Leu-OH protégé ou R₂-Leu-OH protégé.

De plus, des composés de la formule VIII peuvent être préparés en faisant réagir Pro-OR₄ protégé avec une amine de la formule R₃H, où R₃ est tel que décrit précédemment, en utilisant les conditions de réaction indiquées pour la préparation de composés de la formule VIII. Le produit résultant, Pro-R₃ protégé, est transformé en composé non protégé par les procédés indiqués pour l'élimination d'un groupe protecteur d'un composé de la formule VIII. Les composés de la formule Pro-R₃ sont combinés avec des composés connus Arg-OH protégé ou Leu-Arg-OH protégé conformément au procédé indiqué pour la préparation de composés de la formule V.

Enfin, la fonction amide peut être introduite dans un acide libre de la formule



où Y'' est tel que défini précédemment en utilisant le procédé général décrit pour préparer certains des composés de la formule VIII et le composé résultant de la formule



est transformé en composé non protégé comme décrit précédemment dans la préparation de composés de la formule III.

En variante, des composés de la formule III peuvent être préparés par des étapes successives de combinaison et d'élimination de groupe protecteur d'un composé de la formule Y''-Pro-R₃ en utilisant Leu-OH protégé, Arg-OH protégé, Leu-Arg-OH protégé, R₂-OH protégé, en nombre et dans l'ordre approprié, conformément au procédé indiqué pour la préparation de composés de la formule V.

Les composés selon la présente invention forment des sels d'addition d'acide avec n'importe lesquels de divers acides inorganiques et organiques. Des sels d'addition d'acide pharmaceutiquement acceptables sont formés avec des acides comme les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, phosphorique, acétique, succinique, citrique, maléique, malique, gluconique, pamoïque et les acides du même genre. L'invention comprend les sels d'addition d'acide en général, car tout sel toxique peut être transformé en la base libre ou en un sel pharmaceutiquement acceptable. Les formes base libre et sel d'addition d'acide sont convertibles l'une dans l'autre par réglage du pH ou par utilisation de résines échangeuses d'ions. Elles peuvent différer en ce qui concerne les propriétés de solubilité, mais sont par ailleurs équivalentes pour les buts de l'invention.

De plus, les composés selon l'invention et leurs sels d'addition

d'acide peuvent exister dans des formes anhydres aussi bien que dans des formes solvatées, y compris hydratées. En général, les formes hydratées et les formes solvatées avec des solvants pharmaceutiquement acceptables sont équivalentes à la forme anhydre ou non solvatée pour les buts de l'invention. Des hydrates typiques seraient les chlorhydrates ou sulfates mentionnés ci-dessus sous la forme de leurs monohydrates.

On effectue une présélection des octapeptides selon la présente invention en ce qui concerne l'activité antagoniste au LRF in vitro en utilisant des cultures de cellules pituitaires antérieures de rats comme décrit par Vale et autres [Endocrinology, 91, 562 (1972)]. L'inhibition de la libération d'hormone lutéinisante (LH) provoquée par le LRF dans le milieu de culture est le point final dans ce bio-essai in vitro. Les peptides actifs sont ensuite essayés in vivo par les procédés de Humphrey et autres [Endocrinology, 92, 1515 (1972)]. L'activité antagoniste est évaluée par l'inhibition de la libération de LH provoquée par le LRF chez le rat femelle et de l'ovulation provoquée par le LRF chez le lapin.

On donne ci-après les résultats des essais in vitro ci-dessus effectués avec certains composés préférés.

Tableau d'activité pour essai in vitro dans des cultures de cellules pituitaires antérieures de rats

Composé	Conc. molaire.	Quantité de LH ₃ ng/cm ³	% d'inhibition de la libération de LH
N ^ε -Benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide . 1,125 HCl, solvate avec 2 CH ₃ OH.	5x10 ⁻⁸	11,16	95
	1x10 ⁻⁸	19,91	71
	5x10 ⁻⁹	30,85	42
	1x10 ⁻⁹	38,13	23
	LRF (Témoin)	46,58	
	(5x10 ⁻¹⁰)		
	Solution	9,10	
Chlorhydrate de N ^ε -Benzyloxy-carbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide 1,5HCl.2H ₂ O	Saline (Témoin)		
	1x10 ⁻⁸	9,16	99
	6x10 ⁻⁹	10,95	93
	3,5x10 ⁻⁹	11,16	93
	2x10 ⁻⁹	14,48	83
	1x10 ⁻⁹	19,35	68
	6x10 ⁻¹⁰	25,41	50
	2,5x10 ⁻¹⁰	29,88	37
	1x10 ⁻¹⁰	36,48	18
	LRF(Témoin)	42,38	
	3,5x10 ⁻¹⁰		
	Solution	8,72	
	Saline (Témoin)		

Chlorhydrate de N ^α -Benzyloxy-	2x10 ⁻⁸	10,77	94
N ^γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryp-	1x10 ⁻⁸	11,28	92
tophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phé-	6x10 ⁻⁹	15,07	81
nylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-	3,5x10 ⁻⁹	21,76	61
proline N-éthylamide. 1HCl	2x10 ⁻⁹	22,09	60
2,5H ₂ O	1x10 ⁻⁹	23,66	56
	6x10 ⁻¹⁰	25,13	51
	2,5x10 ⁻¹⁰	35,62	20
	1x10 ⁻¹⁰	30,60	35
	LRF (Témoin)	42,38	
	3,5x10 ⁻¹⁰		
	Solution	8,72	
	Saline		
	(Témoin)		

Le facteur de libération de l'hormone lutéinisante (LRF) est connu comme étant formé dans l'hypothalamus de mammifères, d'où il est libéré et transporté par le système porte hypothalamo-hypophysaire à l'antéhypophyse, où il stimule la sécrétion d'hormone lutéinisante. Il est connu que la sécrétion d'hormone lutéinisante, à son tour, effectue l'ovulation chez les animaux d'expérimentation. Ainsi, le LRF peut être utilisé pour causer l'ovulation chez des animaux. (Pour des informations concernant la structure du LRF, qui a été appelé aussi hormone libérant l'hormone lutéinisante, ou LH-RH, et son activité biologique, voir Science, Vol. 174, N° 4008, 29 Octobre 1971, pages 511-512). Ainsi, les octapeptides selon l'invention sont utiles comme contraceptifs pour maîtriser l'ovulation et pour limiter la fécondité.

A des fins médicinales, les composés sont administrés aux patients pour inhiber l'ovulation et donc maîtriser la fécondité. Un niveau de dosage et une voie d'administration proposés sont de 1 à 10 mg (équivalent de base libre) par kilogramme de poids du corps par injection, de préférence par voie intramusculaire.

L'invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1

N^α-BENZYLOXYCARBONYL-L-GLUTAMINYL-L-TRYPTOPHYL-L-SERYL-L-TYROSYL-D-ALANYL-L-LEUCYL-L-ARGINYL-L-PROLYL-N-ETHYLAMIDE

a) N^α-Benzyloxycarbonyl-D-alanine

A une solution de 12,5 g de D-alanine dans 70 cm³ d'hydroxyde de sodium 2N, avec refroidissement à la glace et agitation, on ajoute simultanément par addition goutte à goutte 24 g de chlorure de benzyloxycarbonyle et 35 cm³ d'hydroxyde de sodium 4N. On maintient le pH entre 10 et 12 en utilisant une électrode à pH dans le récipient à réaction. Le mélange réactionnel est agité pendant une heure encore à 4°C et ensuite traité par extraction avec 100 cm³ d'oxyde d'éthyle et acidifié au pH 3 avec de l'acide

chlorhydrique concentré. Le produit précipite et est séparé par²⁵ filtration et séché dans l'air ; 23,5 g, point de fusion 82-85°C ; $[\alpha]_D^{25} + 14,8^\circ$ (c 1, acide acétique 1N). Une deuxième récolte peut être obtenue à partir du filtrat par concentration et refroidissement.

5 b) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-D-alanyl-L-leucine

Une solution de 8,92 g de N^α-benzyloxycarbonyl-D-alanine, de 7,28 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de leucine et de 5,4 g de 1-hydroxybenzotriazole dans 100 cm³ de diméthylformamide est refroidie à 10°C tandis qu'on l'agite et est traitée avec 5,6 cm³ de triéthylamine. Le mélange est agité pendant dix minutes à -10°C et est traité avec 8,6 g de dicyclohexylcarbodiimide. Il est ensuite agité à -10°C pendant 15 minutes, porté à 0°C et agité à 10°C pendant deux heures, après quoi il est agité toute une nuit à 20°C. Le mélange est chauffé à 50°C et agité pendant deux heures.

On filtre le mélange de réaction, en lavant avec 20 cm³ de diméthylformamide. Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite à 40°C pour laisser une huile épaisse. L'huile est dissoute dans 400 cm³ d'acétate d'éthyle et lavée avec quatre portions de 25 cm³ de solution à 5% de bicarbonate de sodium; deux fois avec de l'acide chlorhydrique dilué (1N); deux fois avec une solution saturée de chlorure de sodium, et la solution est séchée sur du sulfate de magnésium anhydre, filtrée et évaporée à 40°C sous pression réduite à une matière solide cristalline. La matière solide est couverte avec 40 cm³ d'éther de pétrole, on ajoute 10 cm³ d'oxyde d'éthyle et la matière solide est fragmentée et séparée par filtration. Le produit fond à 67-70°C et a un $[\alpha]_D^{25}$ de -9,9 (c 2,04, méthanol).

25 c) Chlorhydrate d'ester de méthyle de D-alanyl-L-leucine

Une solution de 7 g d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-D-alanyl-L-leucine dans 100 cm³ de méthanol et 22 cm³ d'acide chlorhydrique 0,95N dans du méthanol est agitée avec 500 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone sous hydrogène à une pression de 2,54 cm d'eau jusqu'à ce que la chromatographie sur couche mince d'un échantillon indique une conversion complète (trois à six heures). On filtre la solution pour éliminer le catalyseur et elle est évaporée jusqu'à formation d'une mousse. Par dissolution dans du chloroforme, 50 cm³, et précipitation par de l'oxyde d'éthyle, on obtient une huile qui est recueillie et séchée à 45°C sous une pression de 1 mm. L'huile est utilisée dans l'étape suivante sans autre purification.

35 d) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-

leucine

Une solution de 8,33 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide [voir Hofmann, J. Am. Chem. Soc., 79, 1636 (1957)] dans 160 cm³ de diméthylformamide est refroidie à -20°C et traitée avec 41 cm³ d'acide chlorhydrique 2,92 N dans du tétrahydrofuranne. La solution est agitée pendant dix minutes à -30°C et traitée avec 3,2 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité entre -30 et -10°C pendant deux heures, refroidi à -40°C et traité avec 19,6 cm³ de triéthylamine. Il est ensuite agité pendant cinq minutes, on ajoute une solution de 5,56 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de D-alanyl-L-leucine dans 30 cm³ de diméthylformamide et le mélange est agité à -10°C pendant une heure, refroidi de nouveau à -40°C et abandonné toute une nuit à 22°C. Le mélange de réaction est chauffé à 50°C avec agitation pendant trois heures et filtré. Le filtrat est évaporé à 40°C sous pression réduite à une huile qui est reprise dans de l'acétate d'éthyle, filtrée et précipitée avec de l'éther et de l'éther de pétrole pour donner une gomme. Le traitement de la gomme avec du méthanol et une petite quantité d'isopropanol donne une matière solide cristalline blanche qui est séparée par filtration et séchée dans l'air. Le produit fond à 175-180°C. La recristallisation à partir d'un mélange d'isopropanol, de méthanol, d'éther et d'éther de pétrole donne une matière fondant à 178-181°C; $[\alpha]_D^{25}$ -41,4° (c, 1,02, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 277 E₁ 27,4.

e) Chlorhydrate d'ester de méthyle de L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine

Une solution de 3 g d'ester de méthyle de N^α-benzyl-oxycarbonyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine dans 100 cm³ de méthanol contenant 3,7 cm³ d'acide chlorhydrique 1,35 N dans du méthanol est agitée avec 200 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone sous une pression d'hydrogène de 2,54 cm d'eau pendant trois heures. La chromatographie sur couche mince d'échantillons de la solution montre la disparition de la matière de départ en deux heures environ. On filtre le mélange de réaction pour éliminer le catalyseur et le filtrat est évaporé à 30-40°C pour donner le produit sous la forme d'une mousse. Le produit est utilisé sans autre purification.

f) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine

Le produit formé en e) est traité avec 1,7 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophane, 25 cm³ de diméthylformamide et 680 mg de 1-hydroxybenzotriazole. Le mélange est agité de manière à donner une solution, refroidi

à -10°C et traité avec 0,7 cm³ de triéthylamine, agité pendant quinze minutes et on ajoute 1,2 g de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité entre -10 et -5°C pendant une heure et entre -5 et 20°C pendant toute une nuit. Il est ensuite agité entre 60°C et -30°C pendant une heure et filtré. Le
 5 filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est dissous dans 30 cm³ de méthanol et un peu d'acétate d'éthyle. L'addition d'oxyde d'éthyle donne une huile précipitée qui est précipitée de nouveau à partir de méthanol avec de l'oxyde d'éthyle et de l'éther de pétrole. L'huile précipitée est séparée par décantation et reprise dans de l'acétate d'éthyle avec un peu d'éthanol.
 10 Par abandon, une matière solide se sépare et on ajoute de l'acétate d'éthyle supplémentaire pour augmenter la cristallisation. Le produit est séparé par filtration et séché dans l'air. De la matière supplémentaire est obtenue à partir des liqueurs-mères de précipitation. La purification est effectuée par dissolution partielle dans de l'éthanol ansohu avec agitation, filtration et
 15 le filtrat éthanologique est évaporé à une mousse et agité avec de l'acétate d'éthyle. La matière solide blanche ainsi obtenue fond à 144-147°C. Le produit est chromatographié sur du gel de silice dans du chloroforme et le produit est obtenu à partir des premiers éluats. Il est cristallisé à partir d'une petite quantité d'acétate d'éthyle pour donner un gel et ensuite à par-
 20 tir de méthanol pour donner un produit d'un point de fusion de 115-120°C ;
 $[\alpha]_D^{25} - 22,3^\circ$ (c 0,99, méthanol).

g) Chlorhydrate d'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine.

Une solution de 1,58 g d'ester de méthyle de N^ε-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine dans 100 cm³ de méthanol
 25 avec 1,6 ml d'acide chlorhydrique 1,3 N dans du méthanol est agitée avec 150 mg de palladium sur carbone sous une pression d'hydrogène de 2,54 cm d'eau pendant deux heures et demie. La chromatographie sur couche mince d'échantillons de la solution montre la disparition de la matière de départ en deux
 30 heures environ. Le catalyseur est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé à 40°C sous pression réduite. Le résidu est utilisé sans autre purification.

h) Ester de méthyle de N^ε-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine

35 On dissout lentement le produit de g), 560 mg de N^ε-benzyloxycarbonyl-L-glutamine et 270 mg de 1-hydroxybenzotriazole dans 20 cm³ de diméthylformamide à 25°C. La solution est refroidie à -10°C et on ajoute 0,28 cm³ de

triéthylamine. On agite le mélange pendant quinze minutes et on le traite avec 570 mg de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est ensuite agité entre -10 et -5°C pendant une heure et demie, et entre -5 et 20°C pendant toute une nuit. Il est ensuite agité entre 30 et 45°C pendant deux heures, refroidi, filtré (lavage avec un peu de diméthylformamide) et le filtrat est évaporé à 40°C sous pression réduite. Le traitement du résidu avec du méthanol produit un gel qui est fragmenté et séparé par filtration. Le produit est ensuite repris dans 20 cm³ de diméthylformamide en chauffant, on ajoute 20 cm³ de méthanol, la solution est traitée avec du charbon actif et filtrée. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est traité avec du méthanol pour produire un gel qui est séparé par filtration et lavé avec un peu de méthanol et un peu d'éther anhydre. La matière solide peut être agitée dans de l'éther anhydre. La matière solide peut être agitée dans de l'éther anhydre, séparée par filtration et séchée à 55°C sous pression réduite quand elle fond à 233-235°C ; $[\alpha]_D^{25}$ -36° (c, 1,03, DMF).

i) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl hydrazide

Une solution de 1,57 g de l'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine dans 20 cm³ de diméthylformamide et 20 cm³ de méthanol est traitée avec 1,5 cm³ d'hydrate d'hydrazine et abandonnée à la température ambiante pendant 72 heures. Une matière solide gélatineuse se sépare. On décante le solvant et le résidu est agité avec 15 cm³ de méthanol et filtré. Le résidu est agité avec du méthanol et de l'éther et filtré. Le produit est séché à 50°C sous pression réduite pour donner 1,58 g de produit, point de fusion 235-240°C.

j) Chlorhydrate d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-proline

Un mélange de 25 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-arginine, de 13,5g de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-proline et de 11 g de 1-hydroxybenzotriazole dans 200 cm³ de diméthylformamide est dissous lentement avec agitation pendant une heure. Le mélange est refroidi à 0°C, traité avec 17 g de dicyclohexylcarbodiimide et agité pendant plusieurs heures avec refroidissement et ensuite toute une nuit à la température ambiante. Le mélange est ensuite chauffé à 30-50°C avec agitation pendant deux heures et abandonné toute une nuit à la température ambiante. On filtre le mélange, en rinçant avec un peu de diméthylformamide, et le filtrat est évaporé à 40°C et sous pression réduite jusqu'à formation d'un résidu huileux. L'huile est dissoute dans une

petite quantité de méthanol et ajoutée lentement à 500 cm³ d'oxyde d'éthyle avec agitation énergique. Les gouttelettes dispersées se solidifient et la matière solide est fragmentée et séparée par filtration. Le produit est ensuite purifié par dissolution dans du méthanol chaud et addition d'acétate d'éthyle jusqu'à apparition d'un trouble et ensuite d'éther jusqu'à opacité. La solution est ensemencée et brassée par tourbillonnage pour cristallisation et on la refroidit pour compléter la cristallisation. Le produit est séparé par filtration et fond à 125-130°C. Deux recrystallisations à partir de méthanol-acétate d'éthyle-éther élèvent le point de fusion à 130-135°C; $[\alpha]_D^{25} - 66^\circ$ (c 1,01, méthanol); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} E_1^{257} 4,5$. La recrystallisation à partir de chloroforme donne une matière fondant à 165-167°C; $[\alpha]_D^{25} - 63^\circ$ (c 1,02, méthanol); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} E_1^{257} 4,7$.

k) Chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamine

A une solution froide de 9,7 g d'éthylamine dans 50 cm³ de méthanol, on ajoute 2 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-proline. Le mélange est abandonné dans une bouteille fermée tenant la pression à la température ambiante et ensuite chauffé de temps à autre à 40-45°C pendant huit jours. Il est ensuite évaporé à un petit volume sous pression réduite. La solution résiduelle est versée goutte à goutte dans de l'oxyde d'éthyle agité pour précipiter une matière solide blanche un peu poisseuse qui est séchée sous pression réduite; $[\alpha]_D^{25} - 53^\circ$ (c 1,02, méthanol); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} E_1^{257} 4,2$.

l) Chlorhydrate de L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide

Une solution de 8,7 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide dans 100 cm³ de méthanol est agitée avec 500 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone sous une pression d'hydrogène de 2,54 cm d'eau pendant trois heures. On élimine le catalyseur par filtration et le filtrat est évaporé sous pression réduite et à 35-40°C. La mousse résiduelle est utilisée sans autre purification.

m) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide

Une solution de 2,455 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl hydrazide dans 40 cm³ de diméthylformamide est refroidie à -20°C et traitée avec 6,15 cm³ d'acide chlorhydrique 2,56 N dans du tétrahydrofuranne. La solution agitée est ensuite

refroidie à -25°C en dix minutes et on ajoute $0,45\text{ cm}^3$ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité entre -35 et -20°C pendant quatre heures et on ajoute $2,2\text{ cm}^3$ de triéthylamine, puis $1,44\text{ g}$ de chlorhydrate de L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide et $0,42\text{ cm}^3$ de triéthylamine. Le mélange est
 5 agité entre -30 et 15°C pendant une heure et demie et à 20°C toute une nuit.

Le mélange est ensuite agitée entre 30° et 50°C pendant trois heures, refroidi dans de la glace et filtré. Le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite et le résidu est traité avec 40 cm^3 de méthanol et 1 cm^3 d'acide chlorhydrique $2,56\text{ N}$ dans du tétrahydrofuranne. La solution
 10 est évaporée de nouveau sous pression réduite pour donner une huile qui est reprise dans 30 cm^3 de méthanol et on ajoute 75 cm^3 d'acétate d'éthyle pour précipiter du chlorhydrate de triéthylamine. Le filtrat est séparé et dilué avec de l'acétate d'éthyle pour donner un précipité couleur de tan. La matière solide est recueillie sur un filtre, après refroidissement, et est
 15 lavée avec de l'acétate d'éthyle et séchée sous pression réduite. Elle se liquéfie à $154-157^{\circ}\text{C}$ avec formation de mousse.

Le produit est purifié encore par chromatographie sur gel de silice en utilisant 20 à 33% de méthanol dans du chloroforme pour élution. On utilise la chromatographie sur couche mince pour évaluer les fractions d'élution
 20 et les fractions contenant un seul produit sont combinées et évaporées à sec. Le résidu est repris dans 200 cm^3 d'eau, isolé par filtration à travers du verre fritté fin et lyophilisé pour donner une matière solide blanche. On fait ensuite déposer le produit à partir de méthanol-chloroforme sous la forme d'un précipité gélatineux de chlorhydrate de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-L-N-éthylamide, qui devient granulaire par chauffage et abandon et est isolé
 25 par filtration et lyophilisé après dissolution dans de l'eau et filtration; ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\text{max}} 280\text{ E}_1^1 58,0$; $[\alpha]_D^{25} -53^{\circ}$ (c $1,0$, méthanol) : $[\alpha]_D^{25} -29,6^{\circ}$ (c $0,908$, 1% CH_3COOH).

30 Une solution de 100 mg de chlorhydrate de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide dans une quantité minimale d'eau, 40 à 50 cm^3 , est placé sur une colonne de Dowex 1×2 (forme acétate) de $1,2 \times 37\text{ cm}$. La matière est ensuite éluee avec de l'eau (150 cm^3), les fractions sont lyophilisées et le
 35 sel d'acide acétique de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamine est examiné à l'ultraviolet dans du méthanol ($\lambda_{\text{max}} 280\text{ E}_1^1 56,3$) et en ce qui concerne le chlorure. L'analyse indique un sel acétate avec $2\text{ CH}_3\text{COOH}$ dans la formule et $5\text{ H}_2\text{O}$ dans la formule moléculaire.

Exemple 2

N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

a) Chlorhydrate d'ester de méthyle de L-séryl-L-tyrosine

5 A un mélange de 8,328 g d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-séryl-L-tyrosine (voir Fischer et Whetstone, J. Am. Chem. Soc., 76, 5076 (1954) et de 500 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone, on ajoute 70 cm³ de méthanol contenant 6,67 cm³ d'acide chlorhydrique 3N dans du tétrahydrofurane et le mélange est agité sous une pression d'hydrogène
10 de 2,54 cm d'eau pendant trois heures. On filtre le mélange pour éliminer le catalyseur et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite pour donner un résidu de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-séryl-L-tyrosine qui est utilisable sans purification supplémentaire.

b) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine

15 Le produit de a) ci-dessus et 11,7 g d'ester de pentachlorophényle de N-benzyloxycarbonyl-L-tryptophane (voir Kovacs et autres, J. Org. Chem. 32, 3696 (1967) sont dissous dans 60 cm³ de diméthylformamide, on refroidit la solution à -10°C en l'agitant et on la traite avec 28 cm³ de triéthylamine. On agite le mélange pendant une heure et demie à -10°C et on le laisse réchauffer à la température ambiante en l'agitant toute une nuit. On
20 filtre le mélange et le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite. Le résidu est dissous deux fois dans du méthanol et le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans 30 cm³ de méthanol et précipité par addition de 300 cm³ d'éther et de 100 cm³ d'éther de pétrole. L'huile précipitée est isolée par décantation et agitée avec 30 cm³
25 d'acétate d'éthyle chaud. Le produit est obtenu par refroidissement et précipitation par addition d'éther et d'éther de pétrole. On le purifie encore en répétant la précipitation à partir de méthanol avec de l'éther de pétrole. Le liquide surnageant est éliminé par décantation et l'huile est
30 séchée à 50°C sous pression réduite. Le produit ainsi obtenu est une mousse couleur de tan qui peut être cristallisée à partir de méthanol, d'éther et d'éther de pétrole par ensemencement ; point de fusion 149-152°C.; $[\alpha]_D^{23}$ -1.8° (c 1,00, méthanol) ; ultraviolet dans méthanol, λ_{max} 289,5 E₁¹ 92, λ_{max} 280 E₁¹ 122.

c) Chlorhydrate d'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine

A un mélange de 3,1 g d'ester de méthyle de N-benzyloxycarbonyl-L-

tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine et de 200 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone, on ajoute 75 cm³ de méthanol contenant 1,7 cm³ d'acide chlorhydrique 3N dans du tétrahydrofur et le mélange est agité sous une atmosphère d'hydrogène pendant deux heures et demie. On filtre le mélange pour éliminer le catalyseur et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un résidu de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine qui est utilisable sans autre purification.

d) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine

Un mélange du produit de c) ci-dessus, de 1,4 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutamine, de 670 mg de 1-hydroxybenztriazole et de 50 cm³ de diméthylformamide est agité et refroidi à -10°C et on ajoute 0,7 cm³ de triéthylamine. Après quinze minutes, on le traite avec 1,2 g de dicyclohexylcarbodiimide et on l'agite pendant quelques heures à -10°C, puis à la température ambiante pendant deux jours et finalement on le laisse reposer pendant trois jours supplémentaires. On filtre la solution et le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite. Le résidu est précipité à partir de méthanol avec de l'eau et ensuite cristallisé trois fois à partir de méthanol; point de fusion 245-248°C; $[\alpha]_D^{25}$ -4,4° (c 1, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 75,7; λ_{\max} 280 E₁¹ 100.

e) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide

Une solution de 1,6 g d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine dans 17 cm³ de diméthylformamide est refroidie à 30°C et traitée avec 3 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est maintenu à 30°C pendant une demi-heure. On filtre la solution et le filtrat est chauffé à 50-60°C pendant dix minutes et ensuite abandonné toute une nuit à 25°C. La matière solide est séparée par filtration et lavée avec du méthanol. La matière solide humide est mise à bouillir dans 25 cm³ de méthanol, on la laisse refroidir et on la sépare par filtration, avec lavage au méthanol et à l'éther. Le produit est séché à 50°C sous pression réduite; point de fusion 260-270°C.; $[\alpha]_D^{25}$ -10,0° (c 1, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,7 E₁¹ 77,2; λ_{\max} 279 E₁¹ 102.

f) Chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Une solution de 18,6 g de chlorhydrate de L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide (Ex 1,1) et de 7,2 g d'ester de p-nitrophényle de N^α-benzyloxycar-

bonyl-L-leucine dans 30 cm³ de diméthylformamide est abandonnée pendant quatre jours, chauffée à 50°C pendant une demi-heure et évaporée sous pression réduite et à 40°C pour donner une huile. Un produit solide est obtenu par chromatographie sur gel de silice, en éluant avec du chloroforme avec un pourcentage croissant de méthanol. Le choix des fractions est effectué d'après analyse par chromatographie sur couche mince et le produit est obtenu à l'état solide par précipitation à partir de méthanol avec de l'acétate d'éthyle et ensuite en versant goutte à goutte une solution méthanolique dans de l'oxyde d'éthyle. La matière solide est séchée à 40°C sous pression réduite; $[\alpha]_D^{25}$ -68,4° (c 1, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 257 E₁¹ 3,5.

g) Chlorhydrate de L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide

A une solution de 1,8 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide dans 100 cm³ de méthanol, on ajoute 400 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone et le mélange est agité sous une atmosphère d'hydrogène pendant quatre heures. La disparition de la matière de départ est déterminée par chromatographie sur couche mince d'échantillons de la solution. On élimine le catalyseur par filtration et le filtrat est évaporé à sec. Le produit est utilisé sans autre purification.

h) Chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Un mélange du produit g) ci-dessus, de 900 mg de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalanine (voir Yajima et Kubo, J. Am. Chem. Soc., 87, 2039 (1965) et de 400 mg de 1-hydroxybenzotriazole est dissous dans 40 cm³ de diméthylformamide et ensuite refroidi et traité avec 700 mg de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité à 23°C pendant trois jours, filtré et le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite. Le résidu est obtenu à l'état solide par précipitation répétée à partir de méthanol au moyen d'éther et au moyen d'acétate d'éthyle et d'éther; se liquéfie à 130-135°C; $[\alpha]_D^{23}$ -69° (c 1,02, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 258 E₁¹ 5,8.

i) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Une solution de 3,75 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide dans 100 cm³ de

méthanol est agitée avec 500 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone et réduite sous une atmosphère d'hydrogène par agitation à la température ambiante pendant trois heures. La disparition de la matière de départ est suivie par chromatographie sur couche mince. On élimine le catalyseur par filtration et le filtrat est évaporé à 40°C sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 30 cm³ de diméthyl formamide et utilisé dans le couplage d'azide ci-après.

Une suspension de 4,16 de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide dans 90 cm³ de diméthylformamide est dissoute par l'addition de 16,4 cm³ d'acide chlorhydrique 2,08 N dans du tétrahydrofurane à 10°C avec agitation. La solution est refroidie à -25°C et traitée avec 0,88 cm³ de nitrite d'isopropyle pendant trois heures entre -10 et -20°C et ensuite avec 4,8 cm³ de triéthylamine à -40°C. La solution d'azide ainsi obtenue est traitée avec la solution ci-dessus de chlorhydrate de D-phénylalanine-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide en utilisant 10 cm³ de diméthylformamide pour rincer le ballon. Le mélange est ensuite agité pendant deux heures entre -10 et 5°C et pendant deux jours à la température ambiante. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite.

Le produit résiduel est dissous dans du méthanol chaud (30 cm³) et on ajoute lentement de l'acétate d'éthyle (30 cm³) en agitant par brassage tourbillonnaire. On ajoute de l'oxyde d'éthyle anhydre (200 cm³) par portions en agitant par brassage tourbillonnaire jusqu'à ce que toute l'huile soit précipitée. La solution étherée est séparée de l'huile par décantation et l'huile est ensuite agitée avec de l'éther anhydre (100 cm³) jusqu'à ce qu'elle devienne une matière solide couleur de tan et la matière solide est isolée par filtration, lavée avec de l'éther anhydre et séchée à l'air (8,8 g). Cette matière solide est dissoute dans du méthanol (15 cm³) par chauffage et on ajoute de l'acétate d'éthyle (20 cm³) et de l'oxyde d'éthyle anhydre (5 cm³). Une petite quantité de matière solide grise précipite et est isolée par filtration et rincée avec un mélange d'acétate d'éthyle (5 cm³) et de méthanol (5 cm³). Au filtrat et aux liquides de lavage, on ajoute de l'éther anhydre (10 cm³) jusqu'à apparition d'un trouble, on chauffe la solution et ensuite elle est abandonnée à 20°C jusqu'à ce qu'une matière solide se sépare et alors on refroidit dans de l'eau glacée. La matière solide est isolée par filtration, rincée avec un mélange de méthanol (10 cm³), d'acétate d'éthyle (10 cm³) et d'éther (10 cm³) et séchée à 50°C sous pression réduite (2,1 g, récolte I).

Le filtrat et les liquides de lavage sont dilués avec de l'acétate d'éthyle (150 cm³) avec agitation tourbillonnaire pour précipiter une huile semi-solide et l'huile est séparée par décantation du solvant. L'huile est dissoute dans un minimum de méthanol chaud, on laisse refroidir la solution et on l'abandonne pendant toute une nuit et la matière solide est séparée par filtration et séchée à 50°C sous pression réduite (4,11 g). Cette matière solide est dissoute dans du méthanol (75 cm³) par chauffage au bain-marie bouillant et la solution claire est concentrée à 50 cm³ par un courant d'air chaud et abandonnée à 25°C pendant plusieurs heures et ensuite refroidie dans de la glace et la matière solide est isolée par filtration, récolte II.

La récolte I et la récolte II sont combinées et agitées dans du méthanol (75 cm³), abandonnées à 20°C toute une nuit, refroidies dans de la glace et séparées par filtration et la matière solide est rincée avec un mélange de méthanol (15 cm³), d'acétate d'éthyle (15 cm³) et d'oxyde d'éthyle (10 cm³) et séchée à 50°C sous pression réduite, 4,4 g. Cette matière solide est dissoute dans du méthanol chaud (200 cm³), on filtre la solution et le filtrat clair est concentré à chaud à 75 cm³ avec un courant d'air filtré et il est abandonné à 20°C pendant cinq heures. La matière solide est isolée par filtration et rincée avec un mélange de méthanol (15 cm³), d'acétate d'éthyle (15 cm³) et d'éther (10 cm³) et partiellement séchée. La matière solide est agitée de nouveau avec du méthanol chaud (50 cm³) et abandonnée toute une nuit à 25°C, refroidie dans de la glace, filtrée et lavée avec 40 cm³ de solvants mélangés et séchés à 50°C sous pression réduite pour donner 3,02 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide [α]_D²³ -71° (c 1,004, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 44,3; λ_{\max} 280 E₁¹ 57,8; [α]_D²³ -27,4° (c 1,03, DMF).

Une solution de 300 mg de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide dans 100 cm³ de méthanol est placée sur une colonne de résine Dowex 1 x 2 (forme acétate) de 1,8 sur 23 cm et la matière est éluée avec du méthanol et recueillie en fractions de 40 cm³. Les fractions 2 à 5 donnent par abandon un produit insoluble. Elles sont combinées et filtrées et le filtrat est concentré à 30 cm³ et dilué avec de l'éther (150 cm³). Le produit qui précipite est isolé par filtration, lavé à l'éther et séché à 50°C sous pression réduite pour donner du sel acétate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-éthylamide [α]_D²³ -29° (c 1,00, DMF); λ_{\max} 41,7 λ_{\max} 280 E₁¹ 54,3.

Exemple 3

N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

a) Chlorhydrate de N^α-t-butoxycarbonyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Une solution de 1,2 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide (Ex. 2f) dans 50 cm³ de méthanol est traitée avec 200 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone et agitée sous une atmosphère d'hydrogène pendant trois heures. La disparition de la matière de départ est suivie par chromatographie sur couche mince. On élimine le catalyseur par filtration et le filtrat est évaporé et le résidu est traité avec 0,608 g de N^α-t-butoxycarbonyl-D-tryptophane et 275 mg de 1-hydroxybenzotriazole dans 30 cm³ de diméthylformamide. La solution est refroidie à -10°C et traitée avec 500 mg de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité à -10°C pendant une heure et ensuite entre 20 et 30°C pendant vingt-quatre heures. La solution est filtrée et rincée avec un peu de diméthylformamide. Le filtrat est évaporé à 40°C sous pression réduite. Le résidu est purifié par dissolution dans du méthanol et de l'acétate d'éthyle et agitation dans de l'éther. La matière solide est précipitée de nouveau à partir de méthanol avec de l'éther et séchée à 40°C sous pression réduite; elle se décompose à 160-165°C; ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max}^{290} E_1^1 60,5$; $\lambda_{\max}^{281} E_1^1 68,5$; $\lambda_{\max}^{273} E_1^1 64,2$.

b) Dichlorhydrate de D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

On élimine le groupe protecteur t-butoxycarbonyle du produit de a) en dissolvant 1,3 g dans 14 cm³ de méthanol et en traitant la solution avec 14 cm³ d'acide chlorhydrique 2N dans du tétrahydrofurane. Après une demi-heure, la solution est évaporée sous pression réduite à 30°C. On précipite le résidu à partir de 15 cm³ de méthanol en versant goutte à goutte la solution dans 100 cm³ d'éther anhydre en agitant et la matière solide est séparée par filtration, lavée à l'éther et séchée à 50°C sous pression réduite.

c) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Une suspension de 1,46 g de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide (Ex. 2e) dans 30 cm³ de diméthylformamide est refroidie à 0°C avec agitation et traitée avec 3,3 cm³ d'acide chlorhydrique 3,64N dans du tétrahydrofurane. La matière solide passe en

solution. La solution est ensuite refroidie à -25°C et traitée avec $0,31\text{ cm}^3$ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité entre 0 et -21°C pendant deux heures et demie et est ensuite traité avec $1,96\text{ cm}^3$ de triéthylamine et ensuite avec le dichlorhydrate de D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide ci-dessus, $1,27\text{ g}$, sous la forme d'une matière solide introduite par rinçage avec 12 cm^2 de diméthylformamide. Le mélange est agité à -25°C et ensuite on le laisse se réchauffer progressivement à 0°C en une heure et à la température ambiante pendant 24 heures. On filtre la solution et le filtrat est évaporé à 50°C sous pression réduite. On dissout le résidu dans 25 cm^3 de méthanol et on ajoute lentement de l'acétate d'éthyle chaud (15 cm^3) jusqu'à ce que la solution soit trouble, on ajoute du méthanol pour clarifier la solution, puis on ajoute de l'oxyde d'éthyle anhydre (5 cm^3) et on clarifie de nouveau la solution avec un peu de méthanol. Par abandon toute une nuit, une matière solide brun clair se sépare et est isolée par filtration et lavée avec un peu de méthanol froid. La matière solide est dissoute dans du méthanol chaud (40 cm^3) et la solution est traitée avec $0,5\text{ g}$ de charbon de bois, filtrée en utilisant un papier-filtre fin et le filtrat est concentré à 40°C avec un courant d'air à un petit volume (15 cm^3). Une petite quantité de matière solide colorée (15 mg) se sépare et est isolée par filtration et on laisse reposer le filtrat et on l'évapore lentement à 20°C en deux jours à un petit volume (5 cm^3) et la matière solide recueillie est isolée par filtration et lavée avec un peu de méthanol froid (10 cm^3) et ensuite séchée à 50°C sous pression réduite pour donner 280 mg de chlorhydrate de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -18,2^{\circ}$ (c $1,02$, DMF); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\text{max}} 290$ $E_1^{1\text{cm}} 80$; $\lambda_{\text{max}} 280,5$ $E_1^{1\text{cm}} 98,0$.

Les filtrats et liquides de lavage recueillis dans le procédé ci-dessus sont évaporés à sec et le résidu est dissous dans du méthanol (25 cm^3), de l'acétate d'éthyle (10 cm^3), de l'éther (5 cm^3) et du chloroforme (15 cm^3) et chromatographiés sur une colonne de 50 g de gel de silice (préparée dans 20% de méthanol 80% de chloroforme) et la colonne est éluée avec un mélange 20:80 méthanol-chloroforme et les fractions contenant le produit désiré, comme indiqué par chromatographie sur couche mince, sont combinées, concentrées à un petit volume et le produit est précipité à l'état solide par l'addition d'éther. La matière solide est dissoute dans du méthanol, la solution est concentrée avec de l'air à un petit volume et abandonnée. La matière solide est séchée à 50°C sous pression réduite pour donner 450 mg du même produit

que ci-dessus $[\alpha]_D^{23} -17,9^\circ$ (c 1,015, DMF); ultraviolet dans méthanol
 λ_{\max} 289,5 E_1^1 81,5 λ_{\max} 280 E_1^1 99,5.

Exemple 4

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

a) Ester de méthyle de N α -benzyloxycarbonyl-D-leucyl-L-leucine

Une solution de 2,65 g de N α -benzyloxycarbonyl-D-leucine $[\alpha]_D^{23}$ Cette matière est préparée par le même procédé qu'utilisé par Grassman et Wunsch, Ber. 91, 462 (1968) pour la DL-leucine et pour la L-leucine voir Losse et Demuth, Ber. 94, 1762 (1961). La matière est une huile comme décrit pour l'énantiomère N-benzyloxycarbonyl-L-leucine. Voir aussi Farthing, J. Chem. Soc. 1950, 3213 et Bergmann, J. BIOL. Chem. 115, 593 (1936) dans 50 cm³ de diméthylformamide est traitée avec 1,98 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-leucine et refroidie dans un bain de glace. La solution est traitée avec 1,4 cm³ de triéthylamine, puis avec 1,5 g de 1-hydroxybenzotriazole et finalement avec 2,26 g de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité toute une nuit avec refroidissement initial par un bain de glace et réchauffement progressif à la température ambiante et ensuite pendant 24 heures supplémentaires à la température ambiante. On filtre le mélange et on évapore le filtrat. On dissout le résidu dans de l'acétate d'éthyle et on lave la solution avec de l'acide chlorhydrique 1N, une solution saturée de chlorure de sodium, une solution à 5% de bicarbonate de sodium et de nouveau avec une solution saturée de chlorure de sodium. La solution à l'acétate de vinyle est séparée et séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le résidu cristallise et est recristallisé à partir d'oxyde d'isopropyle ; $[\alpha]_D^{23} -5,3^\circ$ (c 2,06, méthanol), point de fusion 70-82°C.

b) Chlorhydrate d'ester de méthyle de D-leucyl-L-leucine

Une solution de 1,95 g d'ester de méthyle de N α -benzyloxycarbonyl-D-leucyl-L-leucine dans 50 cm³ de méthanol absolu contenant 2,08 cm³ d'acide chlorhydrique 2,38N dans du méthanol est traitée avec 250 mg de catalyseur à 10% de palladium sur carbone et est secouée dans une atmosphère d'hydrogène jusqu'à ce que la chromatographie sur couche mince d'échantillons de la solution indique que la réaction est parvenue à sa fin. On élimine le catalyseur par filtration et le filtrat est évaporé à sec. Le produit est utilisé sans autre purification.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

c) Ester de méthyle de N^Δ-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucine

Une solution de 2,85 g de N^Δ-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide (Ex, 2e) dans 80 cm³ de diméthylformamide est refroidie à -20°C et traitée avec six équivalents, 8,85 cm³, d'acide chlorhydrique 2,645N dans du tétrahydrofuranne. La solution est ensuite traitée avec 0,81 cm³ de nitrate d'isopentyle et agitée à -20°C pendant trente minutes. Le mélange est refroidi à -25°C et traité avec 3,8 cm³, sept équivalents, de triéthylamine, et ensuite avec 1,3 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de D-leucyl-L-leucine dans 10 cm³ de diméthylformamide refroidis à 5°C. Le ballon est rincé avec un peu de diméthylformamide qui est ajouté aussi au mélange réactionnel. Ce mélange est ensuite agité à -20°C pendant une demi-heure dans un bain sel-glacé pendant trois heures et abandonné dans le réfrigérateur à 3-5°C toute une nuit. Le mélange est ensuite filtré et évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec du tétrahydrofuranne et séparé par décantation. La matière insoluble est mise en suspension dans du dichlorométhane et secouée avec de l'acide chlorhydrique 1N et séparée par filtration. La matière solide est lavée avec du dichlorométhane et séchée sous pression réduite; $[\alpha]_D^{23}$ -22,6° (c 1,01, DMF); ultraviolet dans méthanol; λ_{\max} 289,5 E₁¹ 57,7; λ_{\max} 280 E₁¹ 75,8.

d) N^Δ-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl hydrazide

Une solution de 3,6 g d'ester de méthyle de N^Δ-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucine dans 60 cm³ de diméthylformamide et 20 cm³ de méthanol est traitée avec 3,6 cm³ d'hydrate d'hydrazine et abandonnée à la température ambiante pendant trois jours. Le gel précipité est détruit et on filtre le mélange. La matière solide est lavée au méthanol, puis mise en suspension dans 200 cm³ d'éther pendant trois heures, séparée par filtration et séchée sous pression réduite. On trouve pour le produit $[\alpha]_D^{23}$ -14,3° (c 1,0, DMF); ultraviolet dans méthanol: λ_{\max} 289,5 E₁¹ 56,5; λ_{\max} 280 E₁¹ 74,0.

e) N^Δ-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide

Une solution de 2,2 g de N^Δ-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl hydrazide dans 90 cm³ de diméthylformamide est refroidie à -20°C et traitée avec 5,94 cm³ d'acide chlorhy-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

drique 2,28N dans du tétrahydrofuranne. La solution est ensuite traitée avec 0,49 cm³ de nitrite d'isopentyle et agitée pendant trente minutes à -20°C, refroidie à -25°C et traitée avec 1,88 cm³ de triéthylamine et ensuite avec 835 mg de chlorhydrate de L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide (Ex. 1,1). Le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes et pendant trois heures dans un bain sel-glace, puis il est abandonné toute une nuit à 0-5°C. Le mélange est ensuite filtré et évaporé sous pression réduite à 40-50°C. Le résidu est trituré avec 150 cm³ de tétrahydrofuranne, séparé par décantation et le résidu est dissous dans 30 cm³ de méthanol et ajouté goutte à goutte à 250 cm³ d'acétate d'éthyle avec agitation. Le mélange est abandonné à 0-5°C pendant trois jours et est ensuite filtré. Le produit solide est mis en suspension dans 200 cm³ d'éther, agité pendant deux heures et séparé par filtration. Il en résulte une poudre blanche. Le produit est encore purifié par chromatographie sur gel de silice dans un mélange chloroforme: méthanol: eau (60:45:5) les fractions étant analysées par chromatographie sur couche mince. On trouve une matière essentiellement homogène après un petit nombre de fractions initiales d'éluat. Les fractions choisies sont agitées avec 100 cm³ d'eau, on ajoute de l'acide chlorhydrique 4N jusqu'à réaction acide au papier d'essai et on ajoute 30 cm³ de méthanol. Le mélange est partiellement évaporé à la trompe à eau pour éliminer le méthanol et ensuite lyophilisé, donnant du chlorhydrate de N -benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide ; $[\alpha]_D^{23} -31,4^\circ$ (c, 1,029, DMF); ultraviolet dans méthanol: $\lambda_{\max} 289,5$ E₁ 44,6; $\lambda_{\max} 280$ E₁ 58,4.

Exemple 5

N -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

a) Ester de méthyle de N -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-sérine

Du chlorhydrate d'ester de méthyle de L-sérine, 5 g, est dissous dans 75 cm³ de diméthylformamide et la solution est refroidie dans un bain de glace. On ajoute de la triéthylamine, 4,9 cm³, puis 11,9 g de N -benzyloxycarbonyl-L-tryptophane, 5,25 g de 1-hydroxybenzotriazole et finalement 8,0 g de dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange est agité avec refroidissement au bain de glace toute une nuit, on laisse monter la température à la température ambiante, puis on continue à agiter pendant vingt-quatre heures supplémentaires à la température ambiante. On filtre le mélange et on lave

la matière solide avec du diméthylformamide. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est dissous dans de l'acétate d'éthyle et lavé à l'acide chlorhydrique dilué, avec une solution saturée de sel, trois fois avec une solution à 5% de bicarbonate de sodium, avec une solution saturée de sel et finalement à l'eau. La solution à l'acétate d'éthyle est ensuite séchée sur du sulfate de magnésium et évaporée. Le résidu est cristallisé à partir de 250 cm³ de benzène et ensuite à partir d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole ; 12,5 g; point de fusion 133-135°C., $[\alpha]_D^{23}$ -12,4° (c 2, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 115; λ_{\max} 281 E₁¹ 131; λ_{\max} 274 E₁¹ 122.

b) N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl hydrazide

L'ester de méthyle, 12,3 g, est dissous dans 180 cm³ de méthanol et traité avec 8 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est abandonné à la température ambiante toute une nuit et est filtré. Le produit solide est lavé avec du méthanol froid, mis à bouillir avec 400 cm³ de méthanol et filtré à chaud ; 8,33 g., point de fusion 176-178°C.; $[\alpha]_D^{23}$ -18° (c 2,2, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 117; λ_{\max} 281 E₁¹ 134; λ_{\max} 274 E₁¹ 125.

c) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosine

Du N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl hydrazide, 9,9 g (22,5 mmoles) est dissous dans 150 cm³ de diméthylformamide "spectrograde" et refroidi à -20°C. La solution froide est traitée avec 51 cm³ d'acide chlorhydrique 2,34N dans du tétrahydrofurane et avec 4,7 cm³ de nitrite d'isopentyle (90%) et est agitée à -20°C pendant une demi-heure. La solution est ensuite refroidie à -25°C et traitée avec 20,45 cm³ de triéthylamine et avec 5,74 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-tyrosine. Le mélange est ensuite conservé entre 0 et 5°C toute une nuit et est filtré. On élimine les solvants sous pression réduite. Le résidu est dissous dans de l'acétate d'éthyle et lavé avec de l'acide chlorhydrique 0,1N, une solution saturée de sel, une solution à 5% de bicarbonate de sodium et une solution saturée de sel. L'acétate d'éthyle est séché et évaporé. Le résidu est repris dans de l'éthanol et on effectue une cristallisation par refroidissement et grattage pendant 48 heures. Le produit est séparé sur un entonnoir et lavé à l'éthanol ; 8 g. Les liqueurs éthanoliennes donnent une deuxième récolte de 1,95 g ; $[\alpha]_D^{25}$ -5,8° (c 1,04, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 94,4; λ_{\max} 279 E₁¹ 124.

d) N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide

L'ester de méthyle, 4,5 g, est dissous dans 50 cm³ de méthanol et traité avec 4,5 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant 48 heures. Le produit précipité est séparé par filtration et lavé au méthanol. La matière solide humide est mise en suspension dans 150 cm³ d'éther pendant 2 heures et séparée par filtration; 4,18 g; point de fusion 226-229°C.; $[\alpha]_D^{23}$ -15,6°C. (c 1,01, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 92,6; λ_{\max} 280 E₁¹ 122.

e) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalananyl-L-leucine

Une solution de 6,65 g de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalanine (0,022 mole) et de 4,38 g (0,022 mole) de chlorhydrate d'ester de méthyle de L-leucine dans 60 cm³ de diméthyleformamide "spectrograde" est refroidie (2,24 g). On ajoute du 1-hydroxybenzotriazole, 3,3 g, et du dicyclohexylcarbodiimide, 5 g, et on agite le mélange pendant toute une nuit à la température ambiante et pendant 24 heures encore à la température ambiante. On filtre le mélange et on évapore le solvant sous pression réduite. On dissout le résidu dans 200 cm³ d'acétate d'éthyle et on le lave avec de l'acide chlorhydrique 0,1N, une solution saturée de sel, une solution à 5% de bicarbonate de sodium, une solution saturée de sel et à l'eau. La solution à l'acétate d'éthyle est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et évaporée à un résidu cristallin. Le produit est recristallisé deux fois à partir d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole; 7,3 g.; point de fusion 125-126°C.; $[\alpha]_D^{23}$ -20,3° (c 1,02, méthanol).

f) Chlorhydrate d'ester de méthyle de D-phénylalananyl-L-leucine

Une solution de 7 g (0,016 mole) d'ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-D-phénylalananyl-L-leucine dans 120 cm³ de méthanol est traitée avec 6,12 cm³ d'acide chlorhydrique 2,680N dans du méthanol et réduite avec de l'hydrogène et 500 mg de catalyseur à 10% de palladium sur carbone à la pression atmosphérique. La réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince. On filtre le mélange pour séparer le catalyseur et on évapore la solution; 5,4 g sous la forme d'un verre; $[\alpha]_D^{23}$ -82,5° (c 1,02, méthanol).

g) Ester de méthyle de N^α-benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucine

Une solution de 8,5 g (0,014 mole) de N^α-benzyloxycarbonyl-L-

tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl hydrazide dans 150 cm³ de diméthylformamide est refroidie à -20°C et traitée avec 34,4 cm³ d'acide chlorhydrique 2,56N dans du tétrahydrofurane et ensuite avec 2,68 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité à -20°C pendant une demi-heure, refroidi à -25°C, traité avec 13,73 cm³ de triéthylamine et on ajoute 4,90 g de chlorhydrate d'ester de méthyle de D-phénylalaninyl-L-leucine. On agite le mélange à -20°C pendant trente minutes, entre -20 et -10°C pendant quinze minutes, pendant trois heures dans un bain sel-glacé et pendant toute une nuit entre 0 et 5°C. Le mélange de réaction est filtré sur du verre fritté et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans de l'acétate d'éthyle et lavé avec de l'acide chlorhydrique 0,5N, une solution saturée de sel, une solution à 5% de bicarbonate de sodium, une solution saturée de sel et finalement à l'eau. La solution est séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée et le solvant est évaporé. Le résidu est cristallisé à partir de 125 cm³ de méthanol. Le produit est mis en suspension dans 200 cm³ d'éther pendant deux heures, séparé par filtration et séché ; 6,25 g; point de fusion 221-223°C; $[\alpha]_D^{23} -21^\circ$ (c 1,01, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 66,5; λ_{\max} 280 E₁¹ 86,5.

20 h) Ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucine

On dissout de l'ester de méthyle de N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucine, 6,0 g, dans 140 cm³ de méthanol absolu et on ajoute 800 mg de catalyseur à 20% de palladium sur carbone. Le mélange est réduit sous une atmosphère d'hydrogène, avec contrôle par chromatographie sur couche mince. On élimine le catalyseur par filtration en utilisant un adjuvant de filtration (Super-Cel). Le solvant est évaporé pour laisser un résidu solide qui est séché sous pression réduite et utilisé sans autre traitement.

30 i) Ester de méthyle de N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucine

35 De l'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucine, 1,53 g, est dissous dans 35 cm³ de diméthylformamide, on refroidit la solution dans de la glace et on la traite avec 620 mg de N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-sérine, 311 mg de 1-hydroxybenzotriazole et 475 mg de dicyclohexylcarbodiimide (excès de 10%). Le mélange est agité toute une nuit à la température ambiante. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 500 cm³ d'a-

cétate d'éthyle et lavé avec de l'acide chlorhydrique 0,1N, une solution saturée de sel, une solution à 5% de bicarbonate de sodium, une solution saturée de sel et à l'eau. La solution à l'acétate d'éthyle est séchée sur du sulfate de magnésium et évaporée. La matière solide résiduelle est séchée sous pression réduite ; 2,29 g; point de fusion 200-202°C;
 5 $[\alpha]_D^{23} -19,5^\circ$ (c 1,03, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E_1^{280} 52; λ_{\max} 280 E_1^{280} 68.

j) N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl hydrazide

10 L'ester de méthyle ci-dessus, 2,1 g, est dissous dans 35 cm³ de méthanol et on ajoute 2 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant deux jours, il est ensuite filtré et la matière solide est triturée avec de l'éther pendant une heure. Le produit est séparé par filtration et séché sous pression réduite ; 1,35 g; point
 15 de fusion 200-203°C; $[\alpha]_D^{23} -11,6^\circ$ (c 1,0, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E_1^{280} 57; λ_{\max} 280 E_1^{280} 74,5.

k) N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

20 On dissout du N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl hydrazide, 1,21 g (1,18 mmole) dans 40 cm³ de diméthylformamide "spectrograde" et la solution est agitée et refroidie à -20°C. On ajoute de l'acide chlorhydrique dans du tétrahydrofurane, 2,89 cm³ de solution 2,45N, et ensuite 0,22 cm³ de nitrite d'isopentyle (90%). La solution est agitée trente minutes à -20°C, traitée avec
 25 1,0 cm³ de triéthylamine redistillée et ensuite avec 435 mg de chlorhydrate de L-arginyl-L-proline N-éthylamide. Le mélange est agité entre -20 et -15°C pendant 45 minutes et ensuite à la température du bain de glace pendant 3 heures et conservé toute une nuit dans un réfrigérateur entre 0 et 5°C. On filtre le mélange de réaction et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec 150 cm³ de tétrahydrofurane et ensuite
 30 dissous dans 20 cm³ de méthanol et la solution est versée goutte à goutte, avec agitation, dans 200 cm³ d'acétate d'éthyle. Par abandon toute une nuit à 0°C, le mélange dépose une gomme brune, 480 mg. La solution est décantée et évaporée pour donner une matière solide blanche. Le produit est précipité à partir de méthanol avec de l'éther pour donner 730 mg de produit supplémentaire qui est combiné avec les 480 mg ci-dessus et chromatographié sur gel
 35

de silice dans du chloroform-méthanol (60:45). La séparation est contrôlée par chromatographie sur couche mince. Les fractions combinées sont dissoutes dans 20 cm³ de méthanol et décolorées au charbon, avec filtration à l'aide d'un adjuvant de filtration. Le filtrat est évaporé à 5 cm³ environ et traité avec 100 cm³ d'eau. La solution est réglée au pH 4 avec de l'acide chlorhydrique 1N, congelée et lyophilisée pour donner 960 mg de produit donnant à l'analyse (pour 1,5HCl.3H₂O) les résultats suivants pour 1,5HCl.3H₂O; $[\alpha]_D^{23}$ -58° (c 1,02, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 43,4 ; λ_{\max} 280 E₁¹ 56,5.

Exemple 6

N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-séryl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

a) Ester de méthyle de N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucine

De l'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucine (Ex. 5, h), 1,53 g, est dissous dans 35 cm³ de diméthylformamide et la solution est refroidie dans de la glace. On ajoute de la N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-sérine, 691 mg, avec 311 mg de 1-hydroxybenzotriazole et 475 mg de dicyclohexylcarbodiimide. On agite le mélange toute une nuit à la température ambiante et 24 heures supplémentaires à la température ambiante. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé sous pression réduite. On dissout le résidu dans 500 cm³ d'acétate d'éthyle et on le lave avec de l'acide chlorhydrique 0,5N, une solution saturée de sel, une solution à 5% de bicarbonate de sodium, une solution saturée de sel et finalement à l'eau. La solution est séchée sur du sulfate de magnésium et évaporée. Le résidu est séché sous pression réduite ; 1,92 g; $[\alpha]_D^{23}$ -13,2° (c, 1,03, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 52,5; λ_{\max} 280 E₁¹ 69.

b) N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl hydrazide

L'ester de méthyle de (a), 1,75 g, est dissous dans 40 cm³ de diméthylformamide et traité avec 2,5 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Après 2,5 heures à la température ambiante, on ajoute 15 cm³ de méthanol et on continue la réaction toute une nuit à la température ambiante. Le méthanol est éliminé par évaporation et la solution est diluée avec 80 cm³ d'isopropanol. Le mélange est abandonné toute une nuit à la température ambiante et le

précipité est séparé par filtration, trituré avec de l'éther et séché sous pression réduite ; 1,3 g; point de fusion 240-242°C. déc; $[\alpha]_D^{23}$ -31,2° (c 0,895, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 52,5; λ_{\max} 280 E₁¹ 68,7.

- 5 c) Chlorhydrate de N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

Du N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl hydrazide, 1, 15 g (1,08 mmole) est dissous dans 45 cm³ de diméthylformamide et la solution est refroidie à -20°C. On ajoute six équivalents, 2,64 cm³, d'acide chlorhydrique 2,45N dans du tétrahydrofurane et ensuite 0,22 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité pendant trente minutes à -20°C, refroidi à -25°C et traité avec 0,9 cm³ de triéthylamine (6 équivalents). On ajoute du chlorhydrate de L-arginyl-L-proline N-éthylamide, 400 mg et on agite le mélange à -20°C pendant trente minutes, entre -20 et -10°C pendant quinze minutes, en refroidissant dans un mélange glace-sel pendant trois heures et on le conserve entre 0 et 5°C toute une nuit. On filtre le mélange de réaction et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu vitreux est trituré avec du tétrahydrofurane à froid et on décante le solvant. Le résidu est dissous dans 25 cm³ de méthanol et on verse la solution goutte à goutte dans 250 cm³ d'acétate d'éthyle en agitant. La suspension est conservée à froid pendant deux jours et filtrée. Le produit est séché sous pression réduite; 920 mg. De la matière supplémentaire est obtenue à partir des liqueurs de précipitation par évaporation et reprécipitation dans de l'éther; 550 mg. Le produit est encore purifié par chromatographie sur gel de silice dans du chloroforme-méthanol (60:45). Les fractions éluées dans la colonne sont examinées par chromatographie sur couche mince [silice dans chloroforme-méthanol-eau (60:45:10)]. Les fractions combinées sont dissoutes dans 20 cm³ de méthanol, décolorées avec 450 mg de charbon et la solution est évaporée à 5 cm³ et diluée avec 75 cm³ d'eau. La solution est congelée et lyophilisée pour donner 840 mg de chlorhydrate de N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide ; l'analyse indique 1,5 HCl.2H₂O: $[\alpha]_D^{23}$ -56,2° (c 1,0, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 290 E₁¹ 42,1; λ_{\max} 280 E₁¹ 54,7.

35 Exemple 7

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-thréophénylséryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

a) Ester de cyclohexyle de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-séryll-L-tyrosyll-D-thréo-phénylsérine

De l'ester de cyclohexyle de D-thréo-phénylsérine est préparé par dédoublement d'ester de cyclohexyle de DL-thréo-phénylsérine par cristallisation fractionnée du sel d'acide pyroglutamique comme décrit par Alberti et autres, Gazz. chem. Ital., 83, 930 (1953).

Du N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-séryll-L-tyrosyll hydrazide, 3,0 g (pulvérisé) (Exemple 2, e) est mis en suspension dans 80 cm³ de diméthylformamide et agité à la température ambiante pendant trente minutes. La suspension est refroidie à -20°C et traitée avec 8,64 cm³ d'acide chlorhydrique 2,85N dans du tétrahydrofuranne et agitée pendant trente minutes. On ajoute du nitrite d'isopentyle, 0,86 cm³, et on agite le mélange à -20°C jusqu'à dissolution (1 heure). On ajoute de la triéthylamine, 3,43 cm³, et 1,0 g d'ester de cyclohexyle de D-thréo-phénylsérine. On agite le mélange pendant trente minutes à -20°C, trois heures à la température du bain de glace et on le conserve toute une nuit à 0°C. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner 3,59 g de produit solide : $[\alpha]_D^{23}$ -15,5° (c 1,01, méthanol); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 56,8 ; λ_{\max} 280 E₁¹ 74,6.

b) N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-séryll-L-tyrosyll-D-thréo-phénylséryll hydrazide

L'ester de (a), 3,25 g, est dissous dans 30 cm³ de diméthylformamide et traité avec 3 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est abandonné toute une nuit, dilué avec un volume égal d'éthanol et abandonné de nouveau toute une nuit. On filtre le mélange, la matière solide est triturée avec de l'éther pendant trois heures et séparée par filtration; 2,75 g; point de fusion 226-227°C; $[\alpha]_D^{23}$ -2,8° (c 1,01, DMF) ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 59,1; λ_{\max} 280 E₁¹ 77,5.

c) Ester de méthyle de N^{α} -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyll-L-tryptophyll-L-séryll-L-tyrosyll-D-thréo-phénylséryll-L-leucine

L'hydrazide de (b), 2,67 g, est dissous dans 80 cm³ de diméthylformamide et la solution est refroidie à -20°C. On ajoute six équivalents d'acide chlorhydrique, 6,55 cm³ de solution 2,735N dans du tétrahydrofuranne, et ensuite 0,63 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes, refroidi à -25°C et traité avec 2,91 cm³ (7 équivalents) de triéthylamine et ensuite avec 0,66 g de chlorhydrate d'ester de

méthyle de L-leucine. Le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes, avec refroidissement par un mélange sel-glace pendant trois heures et est conservé toute une nuit à 0-5°C. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans 200 cm³ de dichlorométhane et conservé à froid. La suspension est secouée avec environ 70 cm³ d'eau et filtrée à travers un entonnoir en verre fritté. La matière solide est séchée sous pression réduite ; 2,55 g sous la forme d'un monohydrate; point de fusion 228-235°C; $[\alpha]_D^{23} - 4,4^\circ$ (c 1, MDF); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} 289,5 E_1^{1,57,5}$; $\lambda_{\max} 280 E_1^{1,75,2}$.

10 d) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-thréo-phénylséryl-L-leucyl hydrazide

L'ester de méthyle (c), 2,45 g, est dissous dans 25 cm³ de diméthylformamide, traité avec 2,4 cm³ d'hydrate d'hydrazine et abandonné à la température ambiante pendant trois jours. Le solvant est évaporé et le résidu est trituré avec 50 cm³ de méthanol absolu, refroidi pendant plusieurs heures et séparé par filtration. La matière solide est ensuite triturée avec 150 cm³ d'éther, séparée par filtration et séchée sous pression réduite ; 1,66 g. Une deuxième récolte, 0,51 g, est obtenue à partir des liqueurs méthanoliques en évaporant le solvant et en triturant le résidu avec de l'éthanol et ensuite avec de l'éther. La matière combinée est mise à bouillir avec 50 cm³ de méthanol absolu, refroidie et filtrée; 1,82 g; $[\alpha]_D^{23} - 5,3^\circ$ (c 1,015, DMF); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} 289,5 E_1^{1,56,0}$; $\lambda_{\max} 280 E_1^{1,73,2}$.

e) N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-thréo-phénylséryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

25 On dissout N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-thréo-phénylséryl-L-leucyl hydrazide, 1,7 g (1,7 mmole) est dissous dans 80 cm³ de diméthylformamide et la solution est refroidie à -20°C. On ajoute six équivalents d'acide chlorhydrique, 3,76 cm³ de solution 2,53N dans du tétrahydrofurane, et ensuite 0,33 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes, refroidi à -25°C et traité avec 1,33 cm³ (6 équivalents) de triéthylamine. On ajoute du chlorhydrate de L-arginyl-L-proline N-éthylamide, 580 mg, (1,7 mmole) et le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes, entre -20 et -10°C pendant quinze minutes, trois heures dans un bain sel-glace et conservé toute une nuit entre 0 et 5°C. On filtre le mélange et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré avec 150 cm³ de tétrahydrofurane pendant deux heures à froid et on décante le solvant. On dissout le résidu dans 20 cm³ de méthanol et on verse

goutte à goutte la solution dans 200 cm³ d'acétate d'éthyle en agitant. On conserve le mélange à froid pendant plusieurs jours et on le filtre. Le produit est séché sous pression réduite ; 2,11 g, et chromatographié sur gel de silice dans un mélange chloroforme-méthanol (60:45). Les fractions d'éluat sont contrôlées par chromatographie sur couche mince sur silice avec un mélange chloroforme-méthanol-eau (60:45:10). Les fractions combinées sont évaporées pour donner 1,8 g de produit. Le produit est dissous dans 30 cm³ de méthanol et précipité par versement goutte à goutte dans 250 cm³ d'acétate d'éthyle. Le mélange est conservé à froid toute une nuit, filtré et le produit solide est séché sous pression réduite; 1,2 g de chlorhydrate de N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-thréo-phénylséryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide, donnant à l'analyse pour 1,5HCl.3 H₂O; $[\alpha]_D^{23}$ -17,2 (c 1,03, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 40,6; λ_{\max} 280 E₁¹ 53,0.

Exemple 8

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

a) Chlorhydrate de N α -t-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

Du chlorhydrate de N α -t-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide est préparé à partir de 3,8 g 6,5 mmoles, de chlorhydrate de N α -benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide par élimination du groupe protecteur par la technique d'hydrogénation comme décrit dans l'Exemple 2, pour donner 2,9 g, 6,5 mmoles, de dichlorhydrate de L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide sous la forme d'une matière solide vitreuse. Cette matière est dissoute dans 25 cm³ de diméthylformamide et traitée avec 2,2 g, 6,5 mmoles, d'ester de p-nitrophényle de N α -t-butoxycarbonyl-D-valine. Le mélange est maintenu à la température ambiante pendant quatre jours et est ensuite évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 10 cm³ de méthanol et le produit est précipité par l'addition de 500 cm³ d'éther anhydre. Le produit solide est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un mélange toluène-méthanol (70:30); 1,1 g; $[\alpha]_D^{23}$ -53,5° (c 1,0, méthanol).

De l'ester de p-nitrophényle de N α -t-butoxycarbonyl-D-valine est préparé à partir de 5 g, 24 mmoles, de N α -t-butoxycarbonyl-D-valine, de 4,8 g, 24 mmoles, de dicyclohexylcarbodiimide et de 3,4 g, 24 mmoles,

de p-nitrophénol dissous dans 25 cm³ de diméthylformamide et la solution est abandonnée à la température ambiante toute une nuit. Les matières solides sont séparées par filtration et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. L'huile résiduelle est purifiée par chromatographie sur gel de silice dans un mélange méthanol-benzène (5:95); 5 g; $[\alpha]_D^{23} +21^\circ$ (c 1,0, méthanol); ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} 270 E_1^1$ 204.

b) Chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

Du N^α-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl hydrazide (voir Exemple 2, e); 1,3 g (1,7 mmole), est dissous dans du diméthylformamide, 10 cm³, et la solution est refroidie à -20°C. On ajoute de l'acide chlorhydrique dans du tétrahydrofurane, 4 cm³ (10 mmoles) de solution 2,5N et ensuite 0,2 g, 1,8 mmole, de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité entre -10 et -15°C pendant une heure, après quoi la température est abaissée à -60°C. On ajoute ensuite de la triéthylamine, 1,2 g, 11 mole, puis du dichlorhydrate de D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide (préparé par le traitement du chlorhydrate correspondant de N^α-t-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide, 1,1 g, avec de l'acide chlorhydrique 4N dans 10 cm³ de dioxane pendant une heure et précipitation du chlorhydrate avec de l'éther. Le chlorhydrate est rincé à l'éther et utilisé sans autre purification) dans 5 cm³ de diméthylformamide. Le mélange est abandonné à froid (0°C) pendant 19 heures. Il est ensuite filtré et les matières solides sont rincées avec 10 cm³ de diméthylformamide. L'évaporation des filtrats sous pression réduite donne le produit brut sous la forme d'une gomme brune. La gomme est dissoute dans 5 cm³ de méthanol et la solution est versée goutte à goutte dans 500 cm³ de mélange acétate d'éthyle-éther (1:1) tandis qu'on agite. La matière solide est recueillie par filtration et rincée à l'éther. La précipitation est répétée un total de trois fois. Par chromatographie sur couche mince sur silice avec un mélange chloroforme-méthanol-acide acétique à 32% (60:30:10) on trouve que le produit est accompagné de deux impuretés majeures. Le produit est encore purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice avec un mélange chloroforme-méthanol-acide acétique à 32% (70:30:5). Une chromatographie répétée est nécessaire pour séparer le produit; $[\alpha]_D^{23} -38,6^\circ$ (c 1,01, méthanol); analyse pour 1,5 HCl. 3,5 H₂O; ultraviolet dans méthanol $\lambda_{\max} 289 E_1^1$ 46,8; $\lambda_{\max} 280 E_1^1$ 59,8.

Exemple 9

N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

- 5 a) Ester de méthyle de N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucine

De l'ester de méthyle de L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucine, 1,53 g (Exemple 5, h) est dissous dans 35 cm³ de diméthylformamide "spectrograde" et la solution est refroidie dans un bain de glace. On ajoute de la N γ -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutamide, 777 mg, du 1-hydroxybenzotriazole, 311 mg, et 475 mg de dicyclohexylcarbodiimide, et pendant vingt heures à la température ambiante toute une nuit et pendant vingt heures à la température ambiante. On filtre le mélange et on évapore le filtrat sous pression réduite et on secoue le résidu avec 600 cm³ d'acétate d'éthyle et de l'acide chlorhydrique 0,1N. La matière solide est séparée par filtration, lavée à l'eau et séchée dans l'air et sous pression réduite; 1,68 g; $[\alpha]_D^{23}$ -14° (c 1,035, DMF); ultraviolet dans méthanol γ_{\max} 289,5 E₁¹ 51,4 ; γ_{\max} 280 E₁¹ 67.

De la N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutamine a été préparée par Gibian et Klieger, Ann., 640, 145 (1961).

- 20 b) N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucyl hydrazide

L'ester de méthyle (a), 2,3 g, est dissous dans 35 cm³ de diméthylformamide et traité avec 2,0 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant trois heures, dilué avec 35 cm³ de méthanol absolu et abandonné à la température ambiante pendant vingt heures. On évapore la solution pour éliminer le méthanol, la solution au diméthylformamide résiduelle est traitée avec 35 cm³ d'isopropanol et abandonnée à la température ambiante pendant cinq heures. Le précipité est séparé par filtration, trituré avec de l'éther, séparé par filtration et séché sous pression réduite; 1,78 g sous la forme d'un monohydrate ; point de fusion 245-249°C; $[\alpha]_D^{23}$ -14,9° (c 1,035, DMF); ultraviolet dans méthanol γ_{\max} 289,5 E₁¹ 50,5 ; γ_{\max} 280 E₁¹ 66,0

c) N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide

- 35 Du N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-tyrosyl-D-phénylalananyl-L-leucyl hydrazide, 1,64 g (1,63 mmole) est dissous

dans 40 cm³ de diméthylformamide "spectrograde" et la solution est refroidie à -20°C. On ajoute six équivalents d'acide chlorhydrique, 3,65 cm³ de solution 2,45N dans du tétrahydrofurane, et ensuite 0,3 cm³ de nitrite d'isopentyle. Le mélange est agité à -20°C pendant trente minutes, refroidi à -25°C, traité avec 1,25 cm³ de triéthylamine et ensuite avec 500 mg de chlorhydrate de L-arginyl-L-proline N-éthylamide. Le mélange est agité entre -20 et -15°C pendant 45 minutes, dans un bain glace-sel pendant trois heures et conservé entre 0 et 5°C toute une nuit. On filtre le mélange de réaction et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré dans 150 cm³ de tétrahydrofurane et on décante le solvant. La matière solide est dissoute dans 20 cm³ de méthanol et la solution est versée goutte à goutte dans 200 cm³ d'acétate d'éthyle. Le mélange est refroidi toute une nuit, la matière solide est séparée par filtration et séchée sous pression réduite; 1,81 g. Le produit est encore purifié par mise en suspension dans 200 cm³ d'eau et agitation avec 200 cm³ d'acétate d'éthyle. On filtre le mélange et la matière solide est dissoute dans 250 cm³ de méthanol chaud. La solution est décolorée au charbon et évaporée pour donner une matière solide blanche qui est séchée sous pression réduite; 1,1 g de chlorhydrate de N^α-benzyloxycarbonyl-N^γ-benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide, analyse pour 1 HCl.2,5 H₂O; $[\alpha]_D^{25}$ -22,8° (c 1,02, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 40,3; λ_{\max} 280 E₁¹ 52,6.

Le chlorhydrate (ci-dessus), 800 mg, est traité avec 15 cm³ d'acide acétique 1N, 10 cm³ d'acide acétique 4N et 35 cm³ de méthanol. On ajoute de la résine échangeuse d'ions Dowex 1 x 2 dans la forme acétate, on secoue le mélange et on le filtre à travers un entonnoir en verre fritté. On évapore le filtrat pour éliminer le méthanol et le résidu est congelé et lyophilisé; 650 mg de sel d'acide acétique de N^α-benzyloxycarbonyl-N^γ-benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-phénylalaninyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide, analyse pour 1 CH₃COOH.3 H₂O $[\alpha]_D^{23}$ -30° (c 1,015, DMF); ultraviolet dans méthanol λ_{\max} 289,5 E₁¹ 39,4; λ_{\max} 280 E₁¹ 51,6; essai négatif concernant le chlore ionique.

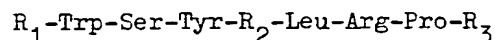
REVENDECATIONS

- 1.- Un octapeptide représenté par la formule

$$R_1\text{-Trp-Ser-Tyr-R}_2\text{-Leu-Arg-Pro-R}_3$$
et les sels correspondants, où R_1 est Z-Gln, Z-Gln (Bzl), Bhoc-Gln, Boc-His (bzl), Z-His (bzl), Boc-Ser (bzl), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bzl), Z-Ile, Boc-Cys (bzl), Z-Phe ou Z-Ser (bzl), R_2 est D-Phe, D-Ala, D-Leu, D-Trp, D-Tyr, D-Tyr (Me), D-Ser, D-Met, D-Arg, D-Val, D-His, D-Gln, D-Phe, D-Thr, D-Pro ou D-Asn et R_3 est NH_2 , NH (alcoyl inférieur), N(alcoyl inférieur) $_2$, NH-benzyle, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (alcoyl inférieur) $_2$ ou $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH-benzyle}$.
- 5 2.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-séryL-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide et ses sels.
- 10 3.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzylxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide et ses sels.
- 15 4.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide et ses sels.
- 20 5.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-éthylamide et ses sels.
- 6.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -t-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-séryL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide et ses sels.
- 25 7.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-phénylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide et ses sels.
- 8.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-thréo-phénylséryL-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide et ses sels.
- 30 9.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyL-L-tryptophyl-L-séryL-L-tyrosyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-éthylamide et ses sels.

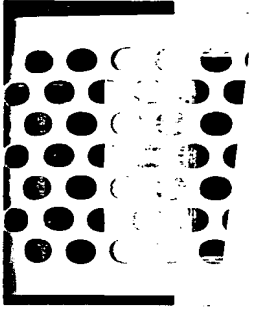
10.- Un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le N -benzyloxycarbonyl-N -benzyl-L-glutaminyll-L-tryptophyl-L-séryll-L-tyrosyll-D-phénylalaninyll-L-leucyll-L-arginyll-L-proline N-éthylamide et ses sels.

5 11.- A titre de médicament, un octapeptide représenté par la formule



et ses sels, où R_1 est Z-Gln, Z-Gln (bz1), Bhoc-Gln, Boc-His (bz1), Z-His -bz1), Boc-Ser (bz1), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bz1), Z-Ile, Boc-Cys (bz1), Z-Phe ou Z-Ser (bz1), R_2 est D-Phe, D-Ala, D-Leu, D-Trp, D-Tyr, D-Tyr (Me);
 10 D-Ser, D-Met, D-Arg, D-Val, D-His, D-Gln, D-Phe, D-Thr, D-Pro ou D-Asn et
 R_3 est NH_2 , NH (alcoyl inférieur), N(alcoyl inférieur) $_2$, NH-benzyle, $NHCH_2CH_2N$ (alcoyl inférieur) $_2$ ou $NHCH_2CH_2SO_2NH$ -benzyle.

12.- Une composition pharmaceutique contenant à titre de substance active un composé selon l'une des revendications 1 à 10.



THIS PAGE BLANK (USPTO)



Isabel A. Leonard, Translator
7 Hearn St., Watertown, MA 02172
(617)441-0072

NOTARIZATION OF TRANSLATION

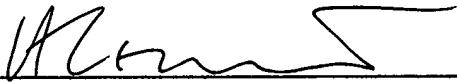
THIS STATEMENT is made this twenty-fourth day of
November, 1997 in Watertown, Massachusetts.

WHEREAS I, Isabel A. Leonard, being experienced in the
translation of the French language into the English language
for a period of thirty years, have been engaged by Lahive &
Cockfield, LLP of Boston, Massachusetts for the purpose of
translating the following document from French into English:

French Patent Application No. FR 2,329,294.

NOW, THEREFORE, I, Isabel A. Leonard hereby affirm that
the attached translation is true and accurate, to the best
of my knowledge and belief.

IN WITNESS WHEREOF I have caused this statement to be
signed and witnessed the day and year first above written.

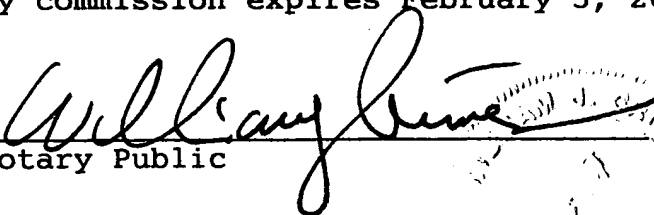


Isabel A. Leonard
Translator


State of Massachusetts

Personally appeared Isabel A. Leonard before me this twenty-
fourth day of November, 1997.

My commission expires February 5, 2004



Notary Public



THIS PAGE BLANK (USPTO)



DT

REPUBLIC OF FRANCE

Publication No.: 2 329 294

(Use only for reprint requests)

NATIONAL INSTITUTE OF
INDUSTRIAL PROPERTY

PARIS

PATENT APPLICATION

No. 76 32587

Novel Octapeptides and Production Methods Therefor

International Classification (Int. Cl²): A 61 K 37/02; C 07 C 103/52

Filing Date: October 28, 1976, 3:27 PM

Priority claimed: *Patent application filed in the United States of America on October 29, 1975, no. 626,909 in the names of Eugene Leroy Wittle, Mildred Catherine Rebstock, Ernest D. Nicolaides, and Alfred Campbell.*

Date application laid open to public inspection: B.O.P.I. "Listes" no. 21 of 5/27/1977.

Applicant: PARKE, DAVIS & COMPANY, residing in the United States of America

Inventor(s):

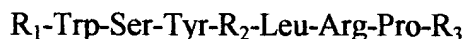
Assignee: (same as Inventor(s))

Agents: Cabinet Regimbeau, Corre, Paillet, Martin et Schrimpf

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The present invention relates to novel peptides useful as "luteinizing hormone release factor" (LRF) antagonists and production methods therefor.

In particular, the invention relates to novel octapeptides represented by the formula



and their salts, where R_1 is Z-Gln, Z-Gln (bzl), Bhoc-Gln, Boc-His (bzl), Z-His (bzl), Boc-Ser (bzl), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bzl), Z-Ile, Boc-Cys (bzl), Z-Phe or Z-Ser (bzl), R_2 is *D*-Phe, *D*-Ala, *D*-Leu, *D*-Trp, *D*-Tyr, *D*-Tyr (Me), *D*-Ser, *D*-Met, *D*-Arg, *D*-Val, *D*-His, *D*-Gln, *D*-Phe, *D*-Thr, *D*-Pro, or *D*-Asn, and R_3 is NH_2 , NH (lower alkoyl), N (lower alkoyl)₂, NH-benzyl, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ (lower alkoyl)₂, or $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH}$ -benzyl; and certain peptides intermediates and their salts used in preparation of these compounds. In Formula I, the classical symbols are used for the amino acid residues of the peptides and the protective groups linked to them, and each one must be construed as having the following meaning: Trp, *L*-tryptophyl; Ser, *L*-seryl; Try, *L*-tyrosyl; Leu, *L*-leucyl; Arg, *L*-arginyl; Pro, *L*-propyl; Z-Gln, $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminy; Z-Gln (bzl), $\text{N}\alpha$ -benzyl- $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminy; Bhoc-Gln, $\text{N}\alpha$ -benzhydryloxycarbonyl-*L*-glutaminy; Boc-His (bzl), $\text{N}\alpha$ -butoxycarbonyl- N^{im} -benzyl-*L*-histidyl; Z-His (bzl), $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl- N^{im} -benzyl-*L*-histidyl; Boc-Ser (bzl), O-benzyl- $\text{N}\alpha$ -*t*-butoxycarbonyl-*L*-seryl; Boc-Pro, $\text{N}\alpha$ -*t*-butoxycarbonyl-*L*-propyl; Z-Leu, $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-leucyl; Boc-Leu, $\text{N}\alpha$ -*t*-butoxycarbonyl-*L*-leucyl; Z-Tyr (bzl), O-benzyl- $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-tyrosyl; Z-Ile, $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-isoleucyl; Boc-Cys (bzl), S-benzyl- $\text{N}\alpha$ -*t*-butoxycarbonyl-*L*-cysteinyl; Z-Phe, $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanyl; Z-Ser (bzl), O-benzyl- $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-seryl; *D*-Phe, *D*-phenylalanyl; *D*-Ala, *D*-alanyl; *D*-Leu, *D*-leucyl; *D*-Trp, *D*-tryptophyl; *D*-Tyr, *D*-tyrosyl; *D*-Tyr (Me); O-methyl-*D*-tyrosyl; *D*-Ser, *D*-seryl; *D*-Met, *D*-methionyl; *D*-Arg, *D*-arginyl; *D*-Val, *D*-valyl; *D*-His, *D*-histidyl; *D*-Gln, *D*-glutaminy; *D*-Phe, *D*-phenylseryl (erythro or threo); *D*-Thr, *D*-threonyl; *D*-Pro, *D*-prolyl; and *D*-Asn, *D*-asparaginy. Moreover, the expression "lower alkoyl" must be construed as designating a portion of a branched or cyclic straight-chained saturated hydrocarbon having up to six

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Formula I will also be used in the formulas that follow for other compounds and each of these symbols must be construed as having the meaning indicated hereinabove.

According to the present invention, Formula I compounds and their acid addition salts are produced by reacting an azide, represented by the formula



II

with a compound with the formula



III

in a nonreactive solvent medium, preferably dimethylformamide, or a dimethylformamide-tetrahydrofuran mixture, where X is R₁-Trp-Ser-Tyr, R₁-Trp-Ser-Tyr-R₂, or R₁-Trp-Ser-Tyr-R₂-Leu, Y is Arg, Leu-Arg, and R₂ and R₃ are as defined above. The compounds with formulas II and III are chosen for reaction such that the resultant product is an octapeptide with Formula I.

The azide with Formula II is prepared and used *in situ* while the compound with Formula III is used with the Arg group in the form of an acid addition salt of a strong acid such as hydrochloride or trifluoroacetate. The two constituents, II and III, are generally made to react in approximately equimolar quantities at temperatures between approximately -30°C and approximately 30°C for sixteen to fifty hours, but temperatures of between 30°C and 50°C can be used with a shortened reaction time.

The Formula I compounds are preferably isolated in the form of an acid addition salt but, if desired, can be isolated in the form of a free base.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The peptide-azide compounds used as reactants in the above method are normally prepared *in situ* by reacting a peptide hydrazide with the formula



IV

where X is as described above, with a lower alkoyl nitrite, preferably isoamyl nitrite, in the presence of an acid in an inert solvent medium such as dimethylformamide, and the resulting azide is then reacted as described above without isolation. The preferred acid for use in the azide preparation is a hydrochloric acid solution in dimethylformamide or tetrahydrofuran; between 3 and 6 acid equivalents are used for each hydrazide (Formula IV) equivalent. The azide is prepared at a temperature between -60° and 10°C . After formation *in situ* of the Formula II azide and before the later peptide-azide reaction with the Formula III compound to form the octapeptide product I, a tertiary amine such as triethylamine is added to the reaction mixture to neutralize the acid used. These azides are also part of the invention.

The peptide-hydrazides with Formula IV above are prepared by various methods. Some of these compounds can exist in the form of acid addition salts such as hydrochloride, sulfate, acetate, citrate, trifluoroacetate, etc. salts, and these salts are included in the invention. The Formula IV hydrazide, where X is as described above, is prepared by reacting an ester with formula

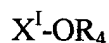


V

where X is as defined above and R_4 is a lower alkoyl group, preferably methyl, with excess hydrazine (1:1.1 to 100) preferably in the form of its hydrate, in an organic solvent such as dimethylformamide, methanol, ethanol, etc. The reaction is generally conducted at room temperature but temperatures between 5°C and 100°C can be used for periods ranging between approximately 30 minutes and approximately 200 hours, preferably for approximately 72 hours.

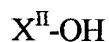
THIS PAGE BLANK (USPTO)

The Formula V esters are prepared by reacting a compound with the formula



VI

wherein R_4 is as defined above and X^I is Trp-Ser-Tyr, R_2 -Leu, Trp-Ser-Tyr- R_2 , Trp-Ser-Tyr- R_2 -Leu, or Leu where R_2 is as defined above or a salt of a compound VI provided a basic center is present in R_2 , with a compound having the formula



VII

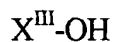
where X^{II} is R_1 , R_1 -Trp-Ser-Tyr, or R_1 -Trp-Ser-Tyr- R_2 in an organic solvent such as dimethylformamide. This coupling reaction can be conducted in a number of ways. Initially, it can be conducted at a temperature of approximately -10°C for two hours, followed by approximately 24 hours at room temperature, using compound VII in the form of its pentachlorophenyl ester and triethylamine. A second technique also uses dimethylformamide as the solvent and a temperature of -10°C to 0°C for the first three hours, followed by two days at room temperature, using 1-hydroxybenztriazole and dicyclohexylcarbodiimide to favor the reaction. A third technique involves converting the Formula VII compound into its methyl ester by normal esterification reactions, or the ester can be obtained directly by synthesis as described in an example below.

The methyl ester is then converted into the corresponding hydrazide according to the indicated method for preparing Formula IV hydrazides and this substance is converted into the corresponding azide using the method described for preparing the Formula II compound and coupled with a Formula VI compound according to the azide coupling techniques described hereinabove.

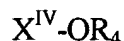
Using the general techniques above in the appropriate order, any of the desired Formula V esters can be built.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The Formula VI esters not already reported in published technical literature are prepared by the same method as indicated for preparation of Formula V compounds according to which a compound with Formula



is combined with a compound with formula



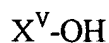
where X^{III} is Trp, R_2 , or Trp-Ser-Tyr, the terminal amino group is protected by a benzyloxycarbonyl, benzhydryloxycarbonyl, or *t*-butoxycarbonyl group, X^{IV} is R_2 , Leu, R_2 -Leu, Ser-Tyr or Ser-Tyr- R_2 -Leu and R_4 is as defined above, after which the benzyloxycarbonyl or benzhydryloxycarbonyl group is eliminated by dissolving the product in methanol, after which treatment is conducted with a palladium-on-carbon catalyst in the presence of molecular hydrogen for a period of approximately two and a half hours at room temperature or the *t*-butoxycarbonyl group is eliminated by mild acid decomposition using a dilute aqueous acid, such as hydrochloric acid or trifluoroacetic acid.

All the compounds with formula $X^{\text{III}}\text{-OH}$ are compounds known in a nonprotected form with the exception of Trp-Ser-Tyr-OH. Although most of the protected compounds are also known, those which do not appear in the published technical literature are prepared by reacting carbobenzoxy chloride or benzhydryloxycarbonyl chloride with the appropriate amino acid in the presence of a base according to the general methods used in peptide chemistry to introduce protective groups or by reacting *t*-butoxycarbonylazide with the appropriate amino acid according to the method described in the text: Solid Peptide Synthesis, J.M. Stewart and J.D. Young, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1969), p. 28. The protected tripeptide is preferably obtained by the coupling techniques described hereinabove using tryptophan protected with Ser-Tyr-OR₄ where R_4 is as defined above. The Ser-Tyr-OR₄ is obtained by eliminating the protective group of the Ser-Tyr-OR₄ carbobenzoxy derivative using the normal techniques described hereinabove.

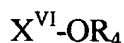
THIS PAGE BLANK (USPTO)

The compound with formula $X^{IV}-OR_4$ where X^{IV} is Leu is reported in the published technical literature and the method for preparing $X^{IV}-OR_4$ where X^{IV} is Ser-Tyr is indicated immediately above. When X^{IV} is Ser-Tyr- R_2 -Leu, the $X^{IV}-OH$ compound is prepared by coupling Ser-Tyr-OH protected with R_2 -Leu- OR_4 , where R_2 and R_4 are as defined above, using the method described above employing an intermediate azide or coupling the two fragments with dicyclohexylcarbodiimide in a nonpolar solvent at room temperature until precipitation of dicyclohexylurea is complete, followed by elimination of the protective group using the techniques described above for this purpose. The R_2 -Leu- OR_4 compounds are prepared by coupling the known protected R_2 -OH compound with known Leu- OR_4 using the azide or dicyclohexylcarbodiimide techniques described above and the techniques for eliminating protective groups described above. When X^{IV} is R_2 , the normal esterification techniques are used.

The Formula VII compounds not already reported in the published technical literature or described in another part of the present specification are prepared using essentially the same method as indicated for preparation of Formula V compounds. A compound with formula



is combined with a compound with formula



where X^V is R_1 -Trp-Ser-Tyr and X^{VI} is R_2 using the method described for preparation of Formula V compounds. Hydrolysis of the resulting esters using an alkali diluted in quantities only slightly greater than the equimolar quantity yields the free acid with Formula VII, or the ester can be used employing hydrazide and azide methods as described elsewhere for directly preparing the Formula VII compound .

The compounds with formula $X^{II}OH$ in which X^{II} and R_1 are all known, with the exception of Bhoc-Gln which is prepared from benzhydryloxycarbonyl hydrazide, sodium nitrite, and *L*-glutamine using aqueous acetic acid as the solvent and a temperature of 5°C. The formula X^V-OH compounds in which X^V is R_1 -Trp-Ser-Tyr are prepared by

THIS PAGE BLANK (USPTO)

reacting a known R_1 -OH compound with the Trp-Ser-Tyr-OR₄ tripeptide according to the method described for preparation of Formula V compounds followed by hydrolysis of the ester, or the ester can be used via the hydrazide and azide coupling method as described elsewhere for directly preparing the Formula VII compound.

The X^{VI}-OR₄ compounds are prepared from known *D*-amino acids by known esterification techniques.

The Formula III compounds and their acid addition salts such as hydrochloride, sulfate, acetate, citrate, trifluoroacetate, benzoate, etc. salts are prepared by various methods. The novel Formula III compounds and their acid addition salts, which are also part of the invention, are those in which Y is Y' and Y' is defined as R₂-Leu-Arg. The Formula III compounds and their acid addition salts in which Y, R₂, and R₃ are as described above are prepared by eliminating the protective group by reduction or eliminating a protective group by acid decomposition from a compound with formula



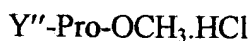
VIII

preferably in the form of its acid addition salt where R₃ is as defined above and Y'' is Arg, Leu-Arg, or preferably R₂-Leu-Arg, where the terminal amino group is protected by a group easily eliminated by reduction such as a benzyloxycarbonyl or benzhydryloxycarbonyl group, the compound being dissolved in a solvent such as a lower alkyl alcohol, preferably methanol, using a noble metal catalyst such as palladium-on-carbon in the presence of molecular hydrogen or by cleavage when the protective group is easily eliminated by acid decomposition such as the *t*-butoxycarbonyl group using an acid such as trifluoroacetic acid, hydrochloric acid, hydrobromic acid, etc. in an appropriate solvent system such as dioxane, dichloromethane, acetic acid, etc. The reduction or acid decomposition reactions are conducted between approximately 10°C and approximately 50°C, preferably at room temperature, for periods ranging from a few minutes to approximately 8 hours, preferably for approximately 15 minutes for the acid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

decomposition reaction. The pH can be adjusted to convert the compound into its free base.

The salts of the Formula VIII compound are prepared from methyl esters with the formula



IX

where Y'' is as described above, which are made to react with a compound chosen from ammonia, a lower alkylamine, or a di(lower alkyl)amine. The reactions are conducted at temperatures between approximately 5°C and approximately 60°C for a period of between a few hours and approximately ten days. When highly volatile amines are used, the reaction is conducted in a pressure-tight closed system.

It is also sometimes advantageous when R_3H is less reactive to prepare Formula III compounds from $P\text{-Pro-R}_3$ (IIIa) where P is an appropriate protective group such as benzyloxycarbonyl or *t*-butyloxycarbonyl. After elimination of the protective group of $P\text{-Pro-R}_3$ by the methods described above, the resulting Pro-R_3 can then be combined with $Y''\text{-OH}$ by normal peptide chemistry techniques such as with dicyclohexylcarbodiimide in *t*-butanol. Elimination of the protective group from the resulting $Y''\text{-Pro-R}_3$ then gives the desired Formula III compound ($Y\text{-Pro-R}_3$).

The $P\text{-Pro-R}_3$ can be prepared by various methods including reaction of R_3H with $P\text{-Pro-OH}$ after the latter compound has been converted into an intermediate activated by means of dicyclohexylcarbodiimide, dicyclohexylcarbodiimide in combination with pentachlorophenol, with diphenylphosphoryl azide (Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 22, 859-63, 1975) or by the mixed anhydride method.

The Formula IX compounds are prepared from known $\text{Pro-OCH}_3\cdot\text{HCl}$ which is combined with protected Arg-OH, protected Leu-Arg-OH, or protected $R_2\text{-Leu-Arg-OH}$ as in the method indicated for preparation of Formula V compounds. A second method for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

preparing certain formula IX compounds involves a combination of Arg-Pro-OCH₃.HCl with known protected Leu-OH compounds or protected R₂-Leu-OH compounds.

In addition, Formula VIII compounds can be prepared by reacting protected Pro-OR₄ with an amine with formula R₃H, where R₃ is as described above, using the reaction conditions indicated for preparation of Formula VIII compounds. The resulting product, protected Pro-R₃, is converted into an unprotected compound by the methods indicated for eliminating a protective group from a Formula VIII compound. The formula Pro-R₃ compounds are combined with known protected Arg-OH or protected Leu-Arg-OH compounds according to the method indicated for preparing Formula V compounds.

Finally, the amide function can be introduced into a free acid with formula



where Y'' is as defined above using the general method described for preparing certain Formula VIII compounds and the resulting compound with the formula



is converted into an unprotected compound as described above in preparation of Formula III compounds.

As a variant, Formula III compounds can be prepared by successive stages of combination and elimination of the protective group of a Y''-Pro-R₃ formula compound using protected Leu-OH, protected Arg-OH, protected Leu-Arg-OH, protected R₂-OH, in an appropriate number and order, according to the method indicated for preparing Formula V compounds.

The compounds according to the present invention form acid addition salts with any of the various inorganic and organic acids. Pharmaceutically acceptable acid addition salts are formed with acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, phosphoric, acetic, succinic, citric, maleic, malic, gluconic, or pantoic acids, and acids of the same type. The invention includes acid addition salts in general, since any toxic salt can be converted

THIS PAGE BLANK (USPTO)

into the free base or into a pharmaceutically acceptable salt. The free base and acid addition salt forms are convertible into each other by adjusting the pH or by using ion exchange resins. They can differ as far as their solubility properties are concerned, but are otherwise equivalent for the goals of the invention.

In addition, the compounds according to the invention and their acid addition salts can exist in anhydrous forms or in solvated forms including hydrated forms. In general, the hydrated and the solvated forms with pharmaceutically acceptable solvents are equivalent to the anhydrous or non-solvated form for the goals of the invention. Typical hydrates would be the hydrochlorides or sulfates referred to hereinabove in the form of their monohydrates.

The octapeptides according to the invention are preselected as regards LRF antagonist activity *in vitro* using rat anterior pituitary cell cultures as described by Vale et al. [Endocrinology, 91, 562 (1972)]. Inhibition of luteinizing hormone (LH) release triggered by LRF in the culture medium is the endpoint in this *in vitro* bioassay. The active peptides are then tested *in vivo* by the Humphrey et al. methods [Endocrinology, 92, 1515, (1972)]. The antagonist activity is evaluated by inhibition of LH release triggered by LRF in the female rat and ovulation triggered by LRF in the rabbit.

The results of the *in vitro* tests above conducted with certain preferred compounds are listed hereinbelow.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Table of Activity for *In Vitro* Testing in Rat Anterior Pituitary Cell Cultures

Compound	Molar Conc.	Quantity of LH ng/cm ³	% LH release inhibition
N α -benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-L-tryptophyl-L-	5x10 ⁻⁸	11.16	95
seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-	1x10 ⁻⁸	19.91	71
L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-	5x10 ⁻⁹	30.85	42
ethylamide . 1.125 HCl	1x10 ⁻⁹	38.13	23
solvated with 2 CH ₃ OH.	LRF (control)	46.58	
	(5x10 ⁻¹⁰)		
	saline solution	9.10	
	(control)		
N α -benzyloxycarbonyl-O-	1x10 ⁻⁸	9.16	99
benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-	6x10 ⁻⁹	10.95	93
seryl-L-tyrosyl-D-	3.5x10 ⁻⁹	11.16	93
phenylalanyl-L-leucyl-L-	2x10 ⁻⁹	14.48	83
arginyl-L-proline N-ethylamide	1x10 ⁻⁹	19.35	68
hydrochloride 1.5 HCl.2H ₂ O	6x10 ⁻¹⁰	25.41	50
	2.5x10 ⁻¹⁰	29.88	37
	1x10 ⁻¹⁰	36.48	18
	LRF (control)	42.38	
	3.5x10 ⁻¹⁰		
	saline solution	8.72	
	(control)		
N α -benzyloxy-N γ -benzyl-L-	2x10 ⁻⁸	10.77	94
glutamyl-L-tryptophyl-L-	1x10 ⁻⁸	11.28	92
seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-	6x10 ⁻⁹	15.07	81
L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-	3.5x10 ⁻⁹	21.76	61
ethylamide hydrochloride.	2 x 10 ⁻⁹	22.09	60
1HCl 2.5H ₂ O	1x10 ⁻⁹	23.66	56
	6x10 ⁻¹⁰	25.13	51
	2.5x10 ⁻¹⁰	35.62	20
	1x10 ⁻¹⁰	30.60	35
	LRF (control)	42.38	
	3.5x10 ⁻¹⁰		
	saline solution	8.72	
	(control)		

The luteinizing hormone release factor (LRF) is known to be formed in the mammal hypothalamus from which it is released and transported by the hypothalamohypophyseal portal system to the anterior pituitary where it stimulates secretion of luteinizing hormone. It is known that secretion of luteinizing hormone, in its turn, elicits ovulation in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

experimental animals. Thus, the LRF can be used to cause ovulation in animals. (For information on this structure of LRF, which has also been called luteinizing hormone releasing hormone, or LH-RH, and its biological activity, see Science, Vol. 174, no. 4008, October 29, 1971, pages 511-512). Thus, the octapeptides according to the invention are useful as contraceptives to control ovulation and limit fertility.

For medicinal purposes, the compounds are administered to the patients to inhibit ovulation and hence control fertility. A proposed dosage level and administration route is 1 to 10 mg (free base equivalent) per kilogram of body weight by injection, preferably by intramuscular injection).

The invention is illustrated by the following examples.

Example 1

N α -BENZYLOXYCARBONYL-L-GLUTAMINYL-L-TRYPTOPHYL-L-SERYL-L-TYROSYL-D-ALANYL-L-LEUCYL-L-ARGINYL-L-PROLYL-L-ETHYLAMIDE

A) N α -benzyloxycarbonyl-D-alanine

24 g benzyloxycarbonyl chloride and 35 cm³ 4N sodium hydroxide are added simultaneously dropwise to a 12.5 g solution of D-alanine in 70 cm³ 2N sodium hydroxide, cooled over ice and agitated. The pH is maintained between 10 and 12 using a pH electrode in the reaction vessel. The reaction mixture is agitated for a further hour at 4°C then treated by extraction with 100 cm³ ethyl oxide and acidified to a pH of 3 with concentrated hydrochloric acid. The product precipitates, is separated by filtration, and dried in air; 23.5 g, melting point 82-85°C; $[\alpha]_D^{25} + 14.8^\circ$ (c 1, 1N acetic acid). A second yield can be obtained from the filtrate by concentration and cooling.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

b) N α -benzyloxycarbonyl-*D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester

A solution of 8.92 g N α -benzyloxycarbonyl-*D*-alanine, 7.28 g leucine methyl ester hydrochloride, and 5.4 g 1-hydroxybenztriazole in 100 cm³ dimethylformamide is cooled to 10°C under agitation and treated with 5.6 cm³ triethylamine. The mixture is agitated for 10 minutes at -10°C and treated with 8.6 g of dicyclohexylcarbodiimide. It is then agitated at -10°C for 15 minutes, raised to 0°C, and agitated at 10°C for two hours, after which it is agitated overnight at 20°C. The mixture is heated to 50°C and agitated for two hours.

The reaction mixture is filtered, while washing with 20 cm³ dimethylformamide. The solvent is then eliminated under negative pressure at 40°C leaving a thick oil. The oil is dissolved in 400 cm³ ethyl acetate and washed with four portions of 25 cm³ of 5% sodium bicarbonate solution; twice with dilute hydrochloric acid (1N); twice with a saturated sodium chloride solution, and the solution is dried on anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated at 40°C under negative pressure into a crystalline solid. The solid substance is covered with 40 cm³ petroleum ether, 10 cm³ ethyl oxide is added, and the solid is fragmented and separated by filtration. The product has a melting point of 67-70°C and has a $[\alpha]_D^{25}$ of -9.9 (c 2.04, methanol).

c) *D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride

A solution of 7 g N α -benzyloxycarbonyl-*D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester in 100 cm³ of methanol and 22 cm³ of 0.95N hydrochloric acid in methanol is agitated with 500 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst in hydrogen at a pressure of 2.54 cm water until thin-layer chromatography of a sample indicates complete conversion (3 to 6 hours). The solution is filtered to eliminate the catalyst and evaporated until a foam forms. By dissolution in 50 cm³ chloroform and precipitation by ethyl oxide, an oil is obtained which is collected and dried at 45°C at a pressure of 1 mm. The oil is used in the next step without further purification.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

d) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*L*-alanyl-*L*-leucine methyl ester

A solution of 8.33 g N α -benzyloxycarbonyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl hydrazide [see Hoffman, J. Am. Chem. Soc., 79, 1636 (1957)] in 160 cm³ of dimethylformamide is cooled to -20°C and treated with 41 cm³ of 2.92N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The solution is agitated for 10 minutes at -30°C and treated with 3.2 cm³ isopentyl nitrite. The mixture is agitated between -30 and -10°C for 2 hours, cooled to -40°C, and treated with 19.6 cm³ triethylamine. It is then agitated for 5 minutes, a solution of 5.56 g *D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride in 30 cm³ dimethylformamide is added, and the mixture is agitated at -10°C for one hour, cooled once more to -40°C, and left to stand overnight at 22°C. The reaction mixture is heated to 50°C with agitation for 3 hours and filtered. The filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure to an oil treated with ethyl acetate, filtered, and precipitated with ether and petroleum ether to yield a gum. The gum is treated with methanol and a small quantity of isopropanol to give a white crystalline solid which is separated by filtration and air-dried. The product has a melting point of 175-180°C. Recrystallization from a mixture of isopropanol, methanol, ether, and petroleum ether gives a substance with a melting point of 178-181°C; $[\alpha]_D^{25}$ -41.4° (c, 1.02, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 277 E₁¹ 27.4

e) *L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride

A solution of 3 g N α -benzyl-oxycarbonyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucine methyl ester in 100 cm³ methanol containing 3.7 cm³ of 1.35N hydrochloric acid in methanol is agitated with 200 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst at a hydrogen pressure of 2.54 cm water for 3 hours. Thin-layer chromatography of samples of the solution shows disappearance of the starting material in approximately 2 hours. The reaction mixture is filtered to eliminate the catalyst and the filtrate is evaporated at 30-40°C to give the product in the form of a foam. The product is used without further purification.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

f) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine methyl ester

The product formed in e) is treated with 1.7 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophan, 25 cm³ dimethylformamide, and 680 mg 1-hydroxybenztriazole. The mixture is agitated to give a solution, cooled to -10°C, and treated with 0.7 cm³ triethylamine, agitated for 15 minutes, and added to 1.2 g dicyclohexylcarbodiimide. The mixture is agitated between -10 and -5°C for one hour and between -5 and 20°C overnight. It is then agitated between 60°C and -30°C for one hour and filtered. The filtrate is evaporated under negative pressure and the residue is dissolved in 30 cm³ methanol and a little ethyl acetate. Additional of ethyl oxide gives a precipitated oil which is reprecipitated from methanol with ethyl oxide and petroleum ether. The precipitated oil is separated by decanting and treated with ethyl acetate with a little ethanol. When it is left to stand, a solid separates out and additional ethyl acetate is added to enhance crystallization. The product is separated by filtration and air-dried. Additional material is obtained from the precipitation mother liquors. Purification is carried out by partial dissolution in absolute ethanol with agitation, and filtration, and the ethanol filtrate is evaporated into a foam and agitated with ethyl acetate. The white solid thus obtained has a melting point of 144-147°C. The product is chromatographed on silica gel in chloroform and the product is obtained from the first eluates. It is crystallized from a small quantity of ethyl acetate to give a gel and then from methanol to give a product with a melting point of 115-120°C; $[\alpha]_D^{25}$ - 22.3° (c 0.99, methanol).

6) L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine methyl ester hydrochloride

A solution of 1.58 g N α -benzyloxytyrcarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine methyl ester in 100 cm³ of methanol with 1.6 mL of 1.3N hydrochloric acid in methanol is agitated with 150 mg of palladium-on-carbon at a hydrogen pressure of 2.54 cm of water for two and a half hours. Thin-layer chromatography of samples of the solution shows that the starting material disappears in about two hours. The catalyst is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

eliminated by filtration and the filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure. The residue is used without further purification.

h) N α -benzyloxycarbonyl-L-glytaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine methyl ester

The product of g), 560 mg of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutamine, and 270 mg 1-hydroxybenztriazole are dissolved slowly in 20 cm³ of dimethylformamide at 25°C. The solution is cooled to -10°C and 0.28 cm³ of triethylamine is added. The mixture is agitated for 15 minutes and treated with 570 mg of dicyclohexylcarbodiimide. The mixture is then agitated between -10 and -5°C for one and a half hours and between -5 and 20°C overnight. It is then agitated between 30 and 45°C for two hours, cooled, and filtered (washed with a little dimethylformamide) and the filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure. Treatment of the residue with methanol produces a gel which is fragmented and separated by filtration. The product is then treated with 20 cm³ dimethylformamide while being heated, 20 cm³ methanol is added, the solution is treated with activated charcoal, and filtered. The filtrate is evaporated under negative pressure and the residue is treated with methanol to produce a gel which is separated by filtration and washed with a little methanol and a little anhydrous ether. The solid can be agitated in anhydrous ether. The solid can be agitated in anhydrous ether, separated by filtration, and dried at 55°C under negative pressure, when it has a melting point of 233-235°C; $[\alpha]_D^{25} -36^\circ$ (c, 1.03, DMF).

i) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucyl hydrazide

A solution of 1.57 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-alanyl-L-leucine methyl ester in 20 cm³ dimethylformamide and 20 cm³ methanol is treated with 1.5 cm³ hydrazine hydrate and left to stand at room temperature for 72 hours. A solid gelatinous substance separates. The solvent is decanted and the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

residue is agitated with 15 cm³ methanol and filtered. The residue is agitated with methanol and ether and filtered. The product is dried at 50°C under negative pressure to yield 1.58 g of product, melting point 235-240°C.

j) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-arginyl-*L*-proline methyl ester hydrochloride

A mixture of 25 g of n ^{α} -benzyloxycarbonyl-*L*-arginine, 13.5 g *L*-proline methyl ester hydrochloride, and 11 g of 1-hydroxybenztriazole in 200 cm³ dimethylformamide is dissolved slowly with agitation for one hour. The mixture is cooled to 0°C, treated with 17 g dicyclohexylcarbodiimide, and agitated for several hours with cooling and then overnight at room temperature. The mixture is then heated to 30-50°C with agitation for 2 hours and left to stand overnight at room temperature. The mixture is filtered, rinsed with a little dimethylformamide, and the filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure until an oily residue forms. The oil is dissolved in a small quantity of methanol and added slowly to 500 cm³ ethyl oxide with vigorous agitation. The dispersed droplets solidify and the solid is fragmented and separated by filtration. The product is then purified by dissolution in warm methanol and addition of ethyl acetate until cloudiness appears and then addition of ether to the point of opacity. The solution is seeded and swirled to crystallize and cooled to complete the crystallization. The product is separated by filtration and has a melting point of 125-120°C. Two recrystallizations from ethyl ether methanol acetate raise the melting point to 130-135°C; $[\alpha]_D^{25}$ -66° (c 1.01, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 257 E₁⁻¹ 4.5. Recrystallization in chloroform gives a substance with a melting point of 165-167°C; $[\alpha]_D^{25}$ -63° (c 1.02, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} E₁⁻¹ 4.7.

k) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamine hydrochloride

2 g of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-arginyl-*L*-proline methyl ester hydrochloride is added to a cold solution of 9.7 g ethylamine in 50 cm³ methanol. The mixture is left in a closed

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pressure-tight cylinder at room temperature, then heated from time to time to 40-45°C for 8 days. It is then evaporated to a small volume under negative pressure. The residual solution is poured dropwise into agitated ethyl oxide to precipitate a white, slightly sticky solid which is dried under negative pressure; $[\alpha]_D^{25} -53^\circ$ (c 1.02, methanol); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 257 \text{ E}_1^{-1} 4.2$.

l) *L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamide hydrochloride

A solution of 8.7 g N α -benzyloxycarbonyl-*L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamide hydrochloride in 100 cm³ methanol is agitated with 500 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst under a hydrogen pressure of 2.54 cm of water for 3 hours. The catalyst is eliminated by filtration and the filtrate is evaporated under negative pressure and at 35-40°C. The residual foam is used without further purification.

m) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamide

A solution of 2.455 g of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl hydrazide in 40 cm³ of dimethylformamide is cooled to -20°C and treated with 6.15 cm³ of 2.56N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The agitated solution is then cooled to -25°C taking ten minutes and 0.45 cm³ of isopentyl nitrite is added. The mixture is agitated between -35 and -20°C for four hours and 2.2 cm³ triethylamine then 1.44 g of *L*-arginine-*L*-propyl-N-ethylamide hydrochloride and 0.42 cm³ triethylamine are added. The mixture is agitated between -30 and 15 °C for one and a half hours and at 20°C overnight.

The mixture is then agitated between 30° and 50°C of three hours, cooled in ice, and filtered. The filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure and the residue is treated with 40 cm³ methanol and 1 cm³ of 2.56 N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The solution is evaporated once again at reduced pressure to give an oil which is treated

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in 30 cm³ methanol, and 75 cm³ ethyl acetate is added to precipitate triethylamine hydrochloride. The filtrate is separated and diluted with ethyl acetate to give a tan-colored precipitate. The solid is collected on a filter, after cooling, and is washed with ethyl acetate and dried under negative pressure. It liquefies at 154-157°C with formation of foam.

The product is purified further by silica gel chromatography using 20 to 33% methanol in chloroform for elution. Thin-layer chromatography is used to evaluate the elution fractions and the fractions containing a single product are combined and evaporated to dryness. The residue is treated in 200 cm³ of water, isolated by filtration through fine sintered glass, and freeze-dried to give a white solid. The product is then deposited from methanol-chloroform in the form of a gelatinous precipitate of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide hydrochloride, which becomes granular by heating and standing and is isolated by filtration and freeze-dried after dissolution in water and filtration; ultraviolet in methanol λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 58.0; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -53° (c 1.0, methanol): $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -29.6° (c 0.908, 1% CH₃COOH).

A solution of 100 mg of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamide hydrochloride in a minimum quantity of water, 40 to 50 cm³, is placed on a Dowex 1x2 (acetate form) measuring 1.2 x 37 cm. The substance is then eluted with water (150 cm³), the fraction are freeze-dried, and the acetic acid salt of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamine is examined under ultraviolet in methanol (λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 56.3) and as far as the chloride is concerned. Analysis indicates an acetate salt with 2 CH₃COOH in the formula and 5 H₂O in the molecular formula.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 2N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamidea) L-seryl-L-tyrosine methyl ester hydrochloride

70 cm³ of methanol containing 6.67 cm³ of 3N hydrochloric acid in tetrahydrofuran is added to a mixture of 8.328 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-seryl-L-tyrosine methyl ester (see Fischer and Whetstone, J. Am. Chem. Soc., 76, 5076 (1954)) and 500 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst, and the mixture is agitated at a hydrogen pressure of 2.54 cm of water for three hours. The mixture is filtered to eliminate the catalyst and the filtrate is evaporated to dryness under negative pressure to give a residue of L-seryl-L-tyrosine methyl ester hydrochloride which is usable without further purification.

b) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosine methyl ester

The product of a) above and 11.7 g of N-benzyloxycarbonyl-L-tryptophan pentachlorophenyl ester (see Kovacs et al., J. Org. Chem., 32, 3696 (1967)) are dissolved in 60 cm³ dimethylformamide, the solution is cooled to -10°C under agitation, and it is treated with 28 cm³ triethylamine. The mixture is agitated for one and a half hours at -10°C and left to warm to room temperature under agitation overnight. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure. The residue is dissolved twice in methanol and the solvent is eliminated under negative pressure. The residue is then treated with 30 cm³ methanol and precipitated by addition of 300 cm³ ether and 100 cm³ petroleum ether. The precipitated oil is isolated by decanting and agitated with 30 cm³ of warm ethyl acetate. The product is obtained by cooling and precipitation by addition of ether and petroleum ether. It is purified once more, repeating precipitation from methanol with petroleum ether. The supernatant liquid is eliminated by decanting and the oil is dried at 50°C under negative pressure. The product thus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

obtained is a tan-colored foam which can be crystallized from methanol, ether, and petroleum ether by seeding; melting point 149-152°C; $[\alpha]_D^{23} -1.8^\circ$ (c 1.00, methanol); ultraviolet in methanol, $\lambda_{\max} 289.5 \text{ E}_1^{-1} 92$, $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1} 122$.

c) *L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosine methyl ester hydrochloride

75 cm³ of methanol containing 1.7 cm³ of 3N hydrochloric acid in tetrahydrofuran is added to a mixture of 3.1 g of N-benzyloxycarbonyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosine methyl ester and 200 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst, and the mixture is agitated under a hydrogen atmosphere for two and a half hours. The mixture is filtered to eliminate the catalyst and the filtrate is evaporated under negative pressure to give a residue of *L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosine methyl ester hydrochloride which is usable without further purification.

d) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosine methyl ester

A mixture of the product of c) above, 1.4 g of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutamine, 670 mg of 1-hydroxybenztriazole, and 50 cm³ of dimethylformamide is agitated and cooled to -10°C and 0.7 cm³ of triethylamine is added. After fifteen minutes, it is treated with 1.2 g of dicyclohexylcarbodiimide and agitated for several hours at -10 °C, then at room temperature for two days, and finally left to stand for three additional days. The solution is filtered and the filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure. The residue is precipitated from methanol with water then crystallized three times from methanol; melting point 245-248°C; $[\alpha]_D^{25} -4.4^\circ$, (c 1, DMF); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 290 \text{ E}_1^{-1} 75.7$; $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1} 100$.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide

A solution of 1.6 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosine methyl ester in 17 cm³ of dimethylformamide is cooled to 30°C and treated with 3 cm³ hydrazine hydrate. The mixture is held at 30°C for half an hour. The solution is filtered and the filtrate is heated to 50-60°C for ten minutes then left to stand overnight at 25°C. The solid substance is separated by filtration and washed with methanol. The wet solid is boiled in 25 cm³ methanol, left to cool, and separated by filtration, washing with methanol and ether. The product is dried at 50°C under negative pressure; melting point 260-270°C; $[\alpha]_D^{25}$ -10.0° (c 1, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.7 E₁¹ 77.2; λ_{\max} 279 E₁¹ 102.

f) N α -benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride

A solution of 18.6 g L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride (Ex 1.1) and 7.2 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-leucine p-nitrophenyl ester in 30 cm³ dimethylformamide is left to stand for four days, heated at 50°C for half an hour, and evaporated under negative pressure at 40°C to give an oil. A solid is obtained by silica gel chromatography, eluting with chloroform with an increasing percentage of methanol. The choice of fractions is made after thin-layer chromatography analysis and the product is obtained in the solid state by precipitation from methanol with ethyl acetate and then by pouring a methanol solution dropwise into ethyl oxide. The solid is dried at 40°C under negative pressure; $[\alpha]_D^{25}$ -68.4° (c 1, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 257 E₁¹ 3.5.

g) L-leucyl-L-arginyl-L-propyl-N-ethylamide hydrochloride

400 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst is added to a solution of 1.8 g N α -benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride in 100 cm³ methanol and the mixture is agitated in a hydrogen atmosphere for 4 hours. Disappearance of the starting substance is determined by thin-layer chromatography of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

samples of the solution. The catalyst is eliminated by filtration and the filtrate is evaporated to dryness. The product is used without further purification.

h) N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide hydrochloride

A mixture of the product of g) above, 900 mg of N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanine (see Yajima and Kubo, J. Am. Chem. Soc., 87, 2039 (1965) and 400 mg of 1-hydroxybenztriazole is dissolved in 40 cm³ dimethylformamide and then cooled and treated with 700 mg dicyclohexylcarbodiimide. The mixture is agitated at 23°C for three days, and filtered, and the filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure. The residue is obtained in the solid state by repeated precipitation from methanol using ether and using ethyl acetate and ether; it liquefies at 130-135°C; $[\alpha]_D^{23}$ -69° (c 1.02, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 258 E₁¹ 5.8.

i) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide

A solution of 3.75 g N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide in 100 cm³ of methanol is agitated with 500 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst and reduced in a hydrogen atmosphere with agitation at room temperature for three hours. Disappearance of the starting material is monitored by thin-layer chromatography. The catalyst is eliminated by filtration and the filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure. The residue is dissolved in 30 cm³ of dimethylformamide and used in the azide coupling hereinbelow.

A suspension of 4.16* of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl hydrazide in 90 cm³ dimethylformamide is dissolved by adding 16.4 cm³ of 2.08

* No unit given. Translator.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

N hydrochloric acid in tetrahydrofuran at 10°C with agitation. The solution is cooled to 25°C and treated with 0.88 cm³ isopropyl nitrate for three hours between -10 and -20°C and then with 4.8 cm³ triethylamine at -40°C. The azide solution thus obtained is treated with the above *D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide hydrochloride solution using 10 cm³ dimethylformamide to rinse the flask. The mixture is then agitated for two hours between -10 and 5°C for 2 days at room temperature. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure.

The residual product is dissolved in warm methanol (30 cm³) and 30 cm³ ethyl acetate is added slowly with swirling agitation. Anhydrous ethyl oxide (200 cm³) is added in portions with swirling until all the oil has precipitated. The ether solution is separated from the oil by decanting and the oil is then agitated with anhydrous ether (100 cm³) until it becomes a solid tan-colored substance and the solid is isolated by filtration, washed with anhydrous ether, and air-dried (8.8 g). This solid is dissolved in methanol (15 cm³) by heating and ethyl acetate (20 cm³) and anhydrous ethyl oxide (5 cm³) are added. A small quantity of a gray solid precipitates and is isolated by filtration and rinsed with a mixture of ethyl acetate (5 cm³) and methanol (5 cm³). Anhydrous ether (10 cm³) is added to the filtrate and the washing liquids until cloudy, the solution is heated, then left to stand at 20°C until a solid separates, after which it is cooled in ice water. The solid is isolated by filtration, rinsed with a mixture of methanol (10 cm³), ethyl acetate (10 cm³), and ether (10 cm³) and dried at 50°C under negative pressure (2.1 g, yield I).

The filtrate and the washing liquids are diluted with ethyl acetate (150 cm³) and agitated by swirling to precipitate a semisolid oil and the oil is decanted from the solvent. The oil is dissolved in a minimum of warm methanol, the solution is left to cool overnight and the solid is separated by filtration and dried at 50°C under negative pressure (4.11 g). This solid is dissolved in methanol (75 cm³) by heating over a boiling water bath and the light solution is concentrated (50 cm³) by a hot air stream and left to stand at 25°C for several hours, then cooled in ice, and the solid is isolated by filtration, yield II.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Yields I and II are combined and agitated in methanol (75 cm³), left to stand overnight at 20°C, cooled in ice, and separated by filtration; the solid is rinsed with a mixture of methanol (15 cm³), ethyl acetate (15 cm³), and ethyl oxide (17 cm³) and dried at 50°C under negative pressure, 4.4 g. This solid is dissolved in warm methanol (200 cm³), the solution is filtered, and the light filtrate is concentrated while hot to 75 cm³ in a stream of filtered air and left to stand at 20°C for five hours. The solid is isolated by filtration and rinsed with a mixture of methanol (15 cm³), ethyl acetate (15 cm³), and ether (10 cm³), and partially dried. The solid is agitated once again with warm methanol (50 cm³) and left to stand overnight at 25°C, cooled in ice, filtered, washed with 40 cm³ of mixed solvents, and dried at 50 °C under negative pressure to give 3.02 g of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-propyl-N-ethylamide hydrochloride $[\alpha]_D^{23} -71^\circ$ (c 1.004, methanol); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 289.5 E_1^{-1} 44.3$; $\lambda_{\max} 280 E_1^{-1} 57.8$; $[\alpha]_D^{23} -27.4^\circ$ (c 1.03, DMF).

A solution of 300 mg of N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide hydrochloride in 100 cm³ of methanol is placed on a Dowex 1 x 2 resin column (acetate form) measuring 1.8 x 23 cm, and the substance is eluted with methanol and collected in 40 cm³ fractions. Fractions 2 to 5 yield an insoluble product when left to stand. They are combined and filtered and the filtrate is concentrated to 30 cm³ and diluted with ether (150 cm³). The product that precipitates is isolated by filtration, washed with ether, and dried at 50°C under negative pressure to yield an N α -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide acetate salt $[\alpha]_D^{23} -29^\circ$ (c 1.00, DMF); $\lambda_{\max} 41.7 \lambda_{\max} 280 E_1^{-1} 54.3$.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 3

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide

a) N α -*t*-butoxycarbonyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride

A 1.2 g solution of N α -benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride (Ex. 2f) in 50 cm³ of methanol is treated with 200 mg of a 20% palladium-on-carbon catalyst and agitated in a hydrogen atmosphere for three hours. Disappearance of the starting substance is tracked by thin-layer chromatography. The catalyst is eliminated by filtration and the filtrate is evaporated and the residue treated with 0.608 g of N α -*t*-butoxycarbonyl-D-tryptophan and 275 mg of 1-hydroxybenztriazole in 30 cm³ dimethylformamide. The solution is cooled to -10°C and treated with 500 mg dicyclohexyldicarbodiimide. The mixture is agitated at -10°C for one hour and then between 20 and 30°C for twenty-four hours. The solution is filtered and rinsed with a little dimethylformamide. The filtrate is evaporated at 40°C under negative pressure. The residue is purified by dissolution in methanol and ethyl acetate and agitated in ether. The solid substance is re-precipitated from methanol with ether and dried at 40°C under negative pressure; it decomposes at 160-165°C; ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 60.5; λ_{\max} 281 E₁¹ 68.5; λ_{\max} 273 E₁¹ 64.2.

b) D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide dihydrochloride

The *t*-butoxycarbonyl protective group is eliminated from the product of a) by dissolving 1.3 g in 14 cm³ methanol and treating the solution with 14 cm³ 2N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. After half an hour, the solution is evaporated under negative pressure at 30°C. The residue is precipitated from 15 cm³ methanol and the solution is poured dropwise into 100 cm³ anhydrous ether under agitation; the solid substance is separated by filtration, washed in ether, and dried at 50°C under negative pressure.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

c) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide

A suspension of 1.46 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide (Ex. 2e) in 30 cm³ dimethylformamide is cooled to 0°C under agitation and treated with 3.3 cm³ of 3.64N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The solid becomes dissolved. The solution is then cooled to -25°C and treated with 0.31 cm³ of isopentyl nitrite. The mixture is agitated between 0 and -21°C for two and a half hours and then treated with 1.96 cm³ triethylamine and then with the D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride above, 1.27 g, in the form of a solid introduced by rinsing with 12 cm² [sic] dimethylformamide. The mixture is agitated at -25°C and then left to warm gradually to 0°C over one hour and left to stand at room temperature for twenty-four hours. The solution is filtered and the filtrate is evaporated at 50°C under negative pressure. The residue is dissolved in 25 cm³ methanol, and warm ethyl acetate (15 cm³) is added slowly until the solution is cloudy, methanol is added to clarify the solution, then anhydrous ethyl oxide (5 cm³) is added and the solution is clarified again with a little methanol. After being left to stand overnight, a light brown solid separates and is isolated by filtration and washed with a little cold methanol. The solid is dissolved in warm methanol (40 cm³) and the solution is treated with 0.5 g wood charcoal, filtered through a fine filter paper, and the filtrate concentrated at 40°C in an air stream in a small volume (15 cm³). A small quantity of colored solid (15 mg) separates and is isolated by filtration; the filtrate is left to stand and evaporated slowly at 20°C over two days to a small volume (5 cm³) and the solid collected is isolated by filtration and washed with a little cold methanol (10 cm³) then dried at 50°C under negative pressure to yield 280 mg of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride, $[\alpha]_D^{23}$, -18.2° (c 1.02, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 80; λ_{\max} 280.5 E₁¹ 98.0.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The filtrates and washing liquids collected with the above method are evaporated to dryness and the residue is dissolved in methanol (25 cm³), ethyl acetate (10 cm³), ether (5 cm³) and chloroform (15 cm³), and chromatographed on a 50 g silica gel column (prepared in 20% methanol, 80% chloroform) and the column is eluted with a 20:80 methanol-chloroform mixture and the fractions containing the desired product, as indicated by thin-layer chromatography, are combined and concentrated to a small volume and the product is precipitated in the solid state by adding ether. The solid is dissolved in methanol, the solution is concentrated with air to a small volume, and left to stand. The solid is dried at 50°C under negative pressure to give 450 mg of the same product as above $[\alpha]_D^{23} -17.9^\circ$ (c 1.015, DMF); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 289.5$, $E_1^{1\%} 81.5$ $\lambda_{\max} 280$ $E_1^{1\%} 99.5$.

Example 4

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide

a) N α -benzyloxycarbonyl-D-leucyl-L-leucine methyl ester

A solution of 2.65 g of N α -benzyloxycarbonyl-D-leucine (this substance is prepared by the same method as used by Grassman and Wunsch, Ber. 91, 462 [1968] for DL-leucine; for L-leucine, see Losse and Demuth, Ber., 94, 1762 [1961]. The substance is an oil as described for the enantiomer N α -benzyloxycarbonyl-L-leucine. See also Farthing, J. Chem. Soc., 1950, 3213 and Bergmann, H. Biol. Chem. 115, 593 [1936]) in 50 cm³ dimethylformamide is treated with 1.98 g L-leucine methyl ester hydrochloride and cooled in an ice bath. The solution is treated with 1.4 cm³ triethylamine then with 1.5 g 1-hydroxybenztriazole and finally with 2.26 g dicyclohexylcarbodiimide. The mixture is agitated overnight, initially cooled by an ice bath and gradually warmed to room temperature, then for an additional twenty-four hours at room temperature. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated. The residue is dissolved in ethyl acetate and the solution washed with 1N hydrochloric acid, saturated sodium chloride solution, 5% sodium bicarbonate solution, and, once again, with saturated sodium chloride solution.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The vinyl acetate solution is separated and dried on magnesium sulfate, filtered, and evaporated. The crystalline residue is recrystallized from isopropyl oxide; $[\alpha]_D^{23} -5.3^\circ$ (c 2.06, methanol), melting point 70-82°C.

b) *D*-leucyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride

A 1.95 g solution of *N*α-benzyloxycarbonyl-*D*-leucyl-*L*-leucine methyl ester in 50 cm³ absolute methanol containing 2.08 cm³ of 2.38N hydrochloric acid in methanol is treated with 250 mg of 10% palladium-on-carbon catalyst and shaken in a hydrogen atmosphere until thin-layer chromatography of samples of the solution indicates that the reaction has come to an end. The catalyst is eliminated by filtration and the filtrate is evaporated to dryness. The product is used without further purification.

c) *N*α-benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-leucyl-*L*-leucine methyl ester

A 2.85 g solution of *N*α-benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl hydrazide (Ex. 2e) in 80 cm³ dimethylformamide is cooled to -20°C and treated with six equivalents (8.85 cm³) of 2.645N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The solution is then treated with 0.81 cm³ isopentyl nitrate and agitated at -20°C for 30 minutes. The mixture is cooled to -25°C and treated with 3.8 cm³, seven equivalents, triethylamine, then with 1.3 g *D*-leucyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride in 10 cm³ dimethylformamide, cooled to 5°C. The flask is rinsed with a little dimethylformamide which is also added to the reaction mixture. This mixture is then agitated at -20°C for half an hour in a salt-ice bath for three hours and left in the refrigerator at 3-5°C overnight. The mixture is then filtered and evaporated under negative pressure. The residue is ground with tetrahydrofuran and separated by decanting. The insoluble substance is suspended in dichloromethane and shaken with 1N hydrochloric acid and separated by filtration. The solid is washed with dichloromethane and dried under

THIS PAGE BLANK (USPTO)

negative pressure; $[\alpha]_D^{23} -22.6^\circ$ (c 1.01, DMF); ultraviolet in methanol; $\lambda_{\max} 289.5 \text{ E}_1^{-1}$ 57.7; $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1}$ 75.8.

d) N α -L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl hydrazide

A 3.6 g solution of N α -L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucine methyl ester in 60 cm³ dimethylformamide and 20 cm³ methanol is treated with 3.6 cm³ hydrazine hydrate and left to stand at room temperature for three days. The precipitated gel is destroyed and the mixture is filtered. The solid is washed in methanol, then suspended in 200 cm³ ether for three hours, separated by filtration, and dried under negative pressure. The following is found for the product: $[\alpha]_D^{23} -14.3^\circ$ (c 1.0, DMF); ultraviolet in methanol: $\lambda_{\max} 289.5 \text{ E}_1^{-1}$ 56.5; $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1}$ 74.0.

e) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide

A 2.2 g solution of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-leucyl-L-leucyl hydrazide in 90 cm³ dimethylformamide is cooled to 20°C and treated with 5.94 cm³ of 2.28N hydrochloric acid in tetrahydrofuran. The solution is then treated with 0.49 cm³ isopentyl nitrite and agitated for thirty minutes at -20°C, cooled to -25°C, and treated with 1.88 cm³ triethylamine and then with 835 mg L-arginyl-L-prolyl-N-ethylamide hydrochloride (Ex. 1.1). The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes and for three hours in a salt-ice bath, then left to stand overnight at 0-5°C. The mixture is then filtered and evaporated under negative pressure at 40-50°C. The residue is ground with 150 cm³ tetrahydrofuran, separated by decanting, and the residue dissolved in 30 cm³ methanol and added dropwise to 250 cm³ ethyl acetate with agitation. The mixture is left to stand at 0-5°C for three days and is then filtered. The solid product is suspended in 200 cm³ ether, agitated for two hours, and separated by filtration. A white powder results. The product is further purified by silica gel chromatography in a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chloroform:methanol:water (60:45:5) mixture, and the fractions are analyzed by thin-layer chromatography. An essentially homogenous substance is found with a small number of initial fractions of eluate. The fractions chosen are agitated with 100 cm³ of water, and 4N hydrochloric acid is added until the test paper exhibits an acid reaction, and 300 cm³ methanol is added. The mixture is partially evaporated with a glass filter pump to eliminate the methanol and then freeze-dried, giving N α -benzyloxycarbonyl- *L*-glutaminy-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-leucyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide hydrochloride; $[\alpha]_D^{23}$ -31.4° (c, 1.029, DMF); ultraviolet in methanol: λ_{\max} 289.5 E₁¹ 44.6; λ_{\max} 280 E₁¹ 58.4.

Example 5

N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-*L*-seryl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-proline-N-ethylamide

a) N α -benzyloxycarbonyl-*L*-tryptophyl-*L*-serine methyl ester

L-serine methyl ester hydrochloride, 5 g, is dissolved in 75 cm³ dimethylformamide and the solution is cooled in an ice bath. 4.9 cm³ triethylamine then 11.9 g N α -benzyloxycarbonyl-*L*-tryptophan, 5.25 g 1-hydroxybenztriazole, and finally 8.0 g dicyclohexylcarbodiimide are added. The mixture is agitated with cooling in the ice bath overnight, the temperature is allowed to rise to room temperature, and agitation is continued for an additional twenty-four hours at room temperature. The mixture is filtered and the solid is washed with dimethylformamide. The filtrate is evaporated under negative pressure and the residue is dissolved in ethyl acetate and washed with dilute hydrochloric acid, with a saturated salt solution, three times with a 5% sodium bicarbonate solution, with a saturated salt solution, and finally with water. The ethyl acetate solution is then dried on magnesium sulfate and evaporated. The residue is crystallized from 250 cm³ benzene and then from ethyl acetate and petroleum ether; 12.5 g; melting point 133-135°C; $[\alpha]_D^{23}$ -12.4° (c 2, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 115; λ_{\max} 281 E₁¹ 131; λ_{\max} 274 E₁¹ 122.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

b) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl hydrazide

Methyl ester, 12.3 g, is dissolved in 180 cm³ methanol and treated with 8 cm³ hydrazine hydrate. The mixture is left to stand at room temperature overnight and filtered. The solid product is washed with cold methanol, boiled with 400 cm³ methanol, and hot-filtered; 8.33 g, melting point 176-178°C; $[\alpha]_D^{23}$ -18° (c 2.2, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 117; λ_{\max} 281 E₁¹ 134; λ_{\max} 274 E₁¹ 125.

c) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosine methyl ester

N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl hydrazide, 9.9 g (22.5 mmol) is dissolved in 150 cm³ of "spectrograde" dimethylformamide and cooled to -20°C. The cold solution is treated with 51 cm³ of 2.34N hydrochloric acid in tetrahydrofuran and with 4.7 cm³ of isopentyl nitrite (90%) and is agitated at -20°C for half an hour. The solution is then cooled to -25°C and treated with 20.45 cm³ triethylamine and with 5.74 g L-tyrosine methyl ester hydrochloride. The mixture is then left to stand between 0 and 5°C overnight and is filtered. The solvents are eliminated under negative pressure. The residue is dissolved in ethyl acetate and washed with 0.1N hydrochloric acid, saturated salt solution, 5% sodium bicarbonate solution, and saturated salt solution. The ethyl acetate is dried and evaporated. The residue is treated in ethanol and crystallization is carried out by cooling and scraping for forty-eight hours. The product is separated in a funnel and washed with ethanol; 8g. The ethanol liquors give a second yield of 1.95 g; $[\alpha]_D^{25}$ -5.8° (c 1.04, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 94.4; λ_{\max} 279 E₁¹ 124.

d) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide

Methyl ester, 4.5 g, is dissolved in 50 cm³ methanol and treated with 4.5 cm³ hydrazine hydrate. The mixture is left to stand at room temperature for 48 hours. The precipitated product is separated by filtration and washed in methanol. The wet solid is suspended at 150 cm³ ether for two hours and separated by filtration; 4.18 g; melting point 226-229°C;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

$[\alpha]_D^{23}$ -15.6°C. (c 1.01, DMF); ultraviolet in methanol of λ_{\max} 289.5 E_1^1 92.6; λ_{\max} 280 E_1^1 122.

e) N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucine methyl ester

A solution of 6.65 g of N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanine (0.022 mol) and 4.38 g (0.022 mol) of *L*-leucine methyl ester hydrochloride in 60 cm³ of "spectrograde" dimethylformamide is cooled (2.24 g). 1-Hydroxybenztriazole, 3.3 g, and dicyclohexylcarbodiimide, 5 g, are added, and the mixture is agitated overnight at room temperature and for a further 24 hours at room temperature. The mixture is filtered and the solvent is evaporated under negative pressure. The residue is dissolved in 200 cm³ ethyl acetate and washed with 0.1N hydrochloric acid, saturated salt solution, 5% sodium bicarbonate solution, saturated salt solution, and water. The ethyl acetate solution is dried on magnesium sulfate, filtered, and evaporated to a crystalline residue. The product is recrystallized twice from ethyl acetate and petroleum ether; 7.3 g; melting point 125-126°C; $[\alpha]_D^{23}$ -20.3° (c 1.02, methanol).

f) *D*-phenylalanyl-*L*-leucine methyl ester hydrochloride

A solution of 7 g (0.016 mol) of N α -benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucine methyl ester in 120 cm³ methanol is treated with 6.12 cm³ of 2.680N hydrochloric acid in methanol and reduced with hydrogen and 500 mg of 10% palladium-on-carbon catalyst at atmospheric pressure. The reaction is tracked by thin-layer chromatography. The mixture is filtered to separate the catalyst and the solution is evaporated; 4.5 g in the form of a glass; $[\alpha]_D^{23}$ -82.5° (c 1.02, methanol).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

g) N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester

A solution of 8.5 g (0.014 mol) of N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide in 150 cm³ dimethylformamide is cooled to -20°C and treated with 34.4 cm³ of 2.56N hydrochloric acid in tetrahydrofuran and then with 2.68 cm³ isopentyl nitrite. The mixture is agitated at -20°C for half an hour, cooled at -25°C, and treated with 13.73 cm³ triethylamine; 4.90 g of D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester hydrochloride is added. The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes, between -20 and -10°C for fifteen minutes, for three hours in a salt-ice bath, and overnight at between 0 and 5°C. The reaction mixture is filtered through sintered glass and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is dissolved in ethyl acetate and washed with 0.5N hydrochloric acid, saturated salt solution, 5% sodium bicarbonate solution, saturated salt solution, and finally with water. The solution is dried on magnesium sulfate, and filtered, and the solvent is evaporated. The residue is crystallized from 125 cm³ methanol. The product is suspended in 200 cm³ ether for 2 hours, separated by filtration, and dried; 6.25 g; melting point 221-223°C; $[\alpha]_D^{23}$ -21° (c 1.01, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁¹ 66.5; λ_{\max} 280 E₁¹ 86.5.

h) L-tryptophyl-L-seryl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester

N α -benzyloxycarbonyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester, 6.0 g, is dissolved in 140 cm³ absolute methanol and 800 mg of 20% palladium-on-carbon catalyst is added. The mixture is reduced in a hydrogen atmosphere and tracked by thin-layer chromatography. The catalyst is eliminated by filtration using a filter aid (Super-Cel). The solvent is evaporated to leave a solid residue which is dried under negative pressure and used without further treatment.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

i) N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-*L*-seryl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucine methyl ester

L-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucine methyl ester, 1.53 g, is dissolved in 35 cm³ dimethylformamide; the solution is cooled in ice, and is treated with 620 mg N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-*L*-serine, 311 mg of 1-hydroxybenztriazole, and 475 mg dicyclohexylcarbodiimide (10% excess). The mixture is agitated overnight at room temperature. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is dissolved in 500 cm³ ethyl acetate and washed with 0.1N hydrochloric acid, saturated salt solution, 5% sodium bicarbonate solution, saturated salt solution, and water. The ethyl acetate solution is dried on magnesium sulfate and evaporated. The residual solid substance is dried under negative pressure; 2.29 g; melting point 200-202°C; $[\alpha]_D^{23}$ -19.5° (c 1.03, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 52; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 68.

j) N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-*L*-seryl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl hydrazide

The above methyl ester, 2.1 g, is dissolved in 35 cm³ methanol and 2 cm³ hydrazine hydrate is added. The mixture is left to stand at room temperature for two days, then filtered and the solid substance is ground with ether for one hour. The product is separated by filtration and dried under negative pressure; 1.35 g; melting point 200-203°C; $[\alpha]_D^{23}$ -11.6° (c 1.0, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 57; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 74.5.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

k) N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline-N-ethylamide

N α -*t*-butoxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl hydrazide, 1.21 g (1.18 mmol) is dissolved in 40 cm³ "spectrograde" dimethylformamide and the solution is agitated and cooled to -20 °C. Hydrochloric acid in tetrahydrofuran, 2.89 cm³ of 2.45N solution, is added, followed by 0.22 cm³ of isopentyl nitrite (90%). The solution is agitated for 30 minutes at -20°C, treated with 1.0 cm³ of redistilled triethylamine, then with 435 mg of L-arginyl-L-proline-N-ethylamide hydrochloride. The mixture is agitated between -20 and -15°C for 45 minutes and then at the temperature of the ice bath for three hours and left to stand overnight in a refrigerator between 0 and 5°C. The reaction mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is ground with 150 cm³ tetrahydrofuran and then dissolved in 20 cm³ methanol and the solution is poured dropwise, with agitation, into 200 cm³ ethyl acetate. When left to stand overnight at 0°C, the mixture deposits a brown gum, 480 mg. The solution is decanted and evaporated to give a white solid. The product is precipitated from methanol with ether to give 730 mg of additional product which is combined with the above 480 mg and chromatographed on silica gel in chloroform-methanol (60:45). The separation is tracked by thin-layer chromatography. The combined fractions are dissolved in 20 cm³ methanol and decolorized with charcoal, and filtered using a filter aid. The filtrate is evaporated to 5 cm³ approximately and treated with 100 cm³ water. The solution is adjusted to pH 4 with 1N hydrochloric acid, frozen, and freeze-dried to give 960 mg of product which gives the following analytical results for 1.5 HCl.3H₂O: $[\alpha]_D^{23}$ -58° (c 1.02, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 43.4; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 56.5.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 6

N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-seryl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

a) n $^{\alpha}$ -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester

L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl methyl ester (Ex. 5, h), 1.53 g, is dissolved in 35 cm³ dimethylformamide and the solution is cooled in ice. N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine, 691 mg, is added, with 311 mg 1-hydroxybenzotriazole and 475 mg dicyclohexylcarbodiimide. The mixture is agitated overnight at room temperature and an additional 24 hours at room temperature. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is dissolved in 500 cm³ ethyl acetate and washed with 0.5N hydrochloric acid, saturated salt solution, 5% sodium bicarbonate solution, saturated salt solution, and finally water. The solution is dried on magnesium sulfate and evaporated. The residue is dried under negative pressure; 1.92 g; $[\alpha]_D^{23}$ -13.2° (c, 1.03, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 52.5; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 69.

b) N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl hydrazide

The methyl ester of (a), 1.75 g, is dissolved in 40 cm³ dimethylformamide and treated with 2.5 cm³ hydrazine hydrate. After 2.5 hours at room temperature, 15 cm³ methanol is added and the reaction is continued overnight at room temperature. The methanol is evaporated by elimination and the solution is diluted with 80 cm³ isopropanol. The mixture is left to stand overnight at room temperature and the precipitate is separated by filtration, ground with ether, and dried under negative pressure; 1.3 g; melting point 240-242°C. dec. $[\alpha]_D^{23}$ -31.2° (c 0.895, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁⁻¹ 52.5; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 68.7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

c) N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl hydrazide, 1.15 g (1.08 mmol) is dissolved in 45 cm³ dimethylformamide and the solution is cooled to -20°C. Six equivalents, 2.64 cm³, of 2.45N hydrochloric acid in tetrahydrofuran are added, followed by 0.22 cm³ isopentyl nitrite. The mixture is agitated for thirty minutes at -20°C, cooled to -25°C, and treated with 0.9 cm³ triethylamine (six equivalents). L-arginyl-L-proline-N-ethylamide hydrochloride, 400 mg, is added and the mixture is agitated at -20°C for thirty minutes and between -20 and -10°C for fifteen minutes, cooled in an ice-salt mixture for three hours, and stored at between 0 and 5°C overnight. The reaction mixture is filtered and the solvent is evaporated under negative pressure. The vitreous residue is ground with tetrahydrofuran cold and the solvent is decanted. The residue is dissolved in 25 cm³ methanol and the solution is poured dropwise into 250 cm³ ethyl acetate, with agitation. The suspension is stored cold for two days and filtered. The product is dried under negative pressure; 920 mg. Additional material is obtained from precipitation liquors by evaporation and reprecipitation in ether; 550 mg. The product is further purified by silica gel chromatography in chloroform-methanol (60:45). The fractions eluted in the column are examined by thin-layer chromatography (silica in chloroform-methanol-water (60:45:10)). The combined fractions are dissolved in 20 cm³ methanol, and decolorized with 450 mg charcoal and the solution is evaporated to 5 cm³ and diluted with 75 cm³ water. The solution is frozen and freeze-dried to give 840 mg N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-arginyl-L-proline-N-ethylamide hydrochloride; analysis indicates 1.5 HCl.2H₂O; $[\alpha]_D^{23}$ -56.2° (c 1.0, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 290 E₁¹ 42.1; λ_{\max} 280 E₁¹ 54.7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 7

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline-N-ethylamide

a) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylserine cyclohexyl ester

D-threophenylserine cyclohexyl ester is prepared by doubling *DL*-threophenylserine cyclohexyl ester by fractional crystallization of pyroglutamic acid salt as described by Alberti et al., Gazz. chem. Ital., 83, 930 (1953).

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide, 3.0 g (powdered) (Example 2, e) is suspended in 80 cm³ dimethylformamide and agitated at room temperature for thirty minutes. The suspension is cooled to -20°C and treated with 8.64 cm³ of 2.85N hydrochloric acid in tetrahydrofuran and agitated for thirty minutes. Isopentyl nitrite, 0.86 cm³, is added and the mixture is agitated at -20°C until it dissolves (one hour). Triethylamine, 3.43 cm³, and 1.0 g *D*-threophenylserine cyclohexyl ester are added. The mixture is agitated for thirty minutes at -20°C and three hours at the temperature of the ice bath, and stored overnight at 0°C. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure to give 3.59 g of solid product: $[\alpha]_D^{23}$ -15.5° (c 1.01, methanol); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁¹ 56.8; λ_{\max} 280 E₁¹ 74.6.

b) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl hydrazide

The ester of (a), 3.25 g, is dissolved in 30 cm³ dimethylformamide and treated with 3 cm³ hydrazine hydrate. The mixture is left to stand overnight, diluted with an equal volume of ethanol, and left to stand for a further night. The mixture is filtered, the solid material is ground with ether for three hours and separated by filtration; 2.75 g; melting point 226-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

227°C; $[\alpha]_D^{23}$ -2.8° (c 1.01, DMF) ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E_1^1 59.1; λ_{\max} 280 E_1^1 77.5.

c) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucine methyl ester

The hydrazide of (b), 2.67 g, is dissolved in 80 cm³ dimethylformamide and the solution is cooled to -20°C. Six equivalents of hydrochloric acid, 6.55 cm³ of 2.735N solution in tetrahydrofuran, are added followed by 0.63 cm³ isopentyl nitrite. The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes, cooled to -25°C, and treated with 2.91 cm³ (seven equivalents) of triethylamine and then with 0.66 g of L-leucine methyl ester hydrochloride. The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes while being cooled by a salt-ice mixture for three hours and is stored overnight at 0-5°C. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is suspended in 200 cm³ dichloromethane and stored in the refrigerator. The suspension is shaken in about 70 cm³ water and filtered through a sintered glass funnel. The solid substance is dried under negative pressure; 2.55 g in the form of a monohydrate; melting point 228-235°C; $[\alpha]_D^{23}$ -4.4° (c 1, MDF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E_1^1 57.5; λ_{\max} 280 E_1^1 75.2.

d) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl hydrazide

The methyl ester (c), 2.45 g, is dissolved in 25 cm³ dimethylformamide, treated with 2.4 cm³ hydrazine hydrate, and left to stand at room temperature for three days. The solvent is evaporated and the residue is ground with 50 cm³ absolute methanol, cooled for several hours and separated by filtration. The solid substance is then ground with 150 cm³ ether, separated by filtration, and dried under negative pressure; 1.66 g. A second yield, 0.51 g, is obtained from methanol liquors by evaporating the solvent and grinding the residue with ethanol and then with ether. The combined substance is boiled with 50

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cm³ absolute methanol, cooled and filtered; 1.82 g; $[\alpha]_D^{23} -5.3^\circ$ (c 1.015, DMF); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 289.5 \text{ E}_1^{-1} 56.0$; $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1} 73.2$.

e) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl hydrazide, 1.7 g (1.7 mmol) is dissolved in 80 cm³ dimethylformamide and the solution is cooled to -20°C. Six equivalents of hydrochloric acid, 3.76 cm³ of 2.53N solution in tetrahydrofuran, are added followed by 0.33 cm³ isopentyl nitrite. The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes, cooled to -25°C, and treated with 1.33 cm³ (six equivalents) of triethylamine. L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride, 580 mg (1.7 mmol) is added and the mixture is agitated at -20°C for thirty minutes, between -20 and -10°C for fifteen minutes, three hours in a salt-ice bath, and stored overnight between 0 and 5°C. The mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is ground with 150 cm³ tetrahydrofuran for two hours under cold conditions and the solvent is decanted. The residue is dissolved in 20 cm³ methanol and the solution is poured dropwise into 200 cm³ ethyl acetate with agitation. The mixture is kept cold for several days and filtered. The product is dried under negative pressure, 2.11 g, and chromatographed on silica gel in a chloroform-methanol (60:45) mixture. The eluate fractions are tracked by thin-layer chromatography on silica with a chloroform-methanol-water (60:45:10) mixture. The combined fractions are evaporated to give 1.8 g of product. The product is dissolved in 30 cm³ methanol and precipitated by pouring dropwise into 250 cm³ ethyl acetate. The mixture is kept cold overnight, and filtered, and the solid product is dried under negative pressure; 1.2 g of N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride, giving on analysis for 1.5 HCl.3H₂O: $[\alpha]_D^{23} -17.2$ (c 1.03, DMF); ultraviolet in methanol $\lambda_{\max} 289.5 \text{ E}_1^{-1} 40.6$; $\lambda_{\max} 280 \text{ E}_1^{-1} 53.0$.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 8

N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-L-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

a) N α -*t*-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

N α -*t*-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride is prepared from 3.8 g (6.5 mmol) of N α -benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride by elimination of the protective group by the hydrogenation technique as described in Example 2, to give 2.9 g (6.5 mmol) of L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide dihydrochloride in the form of a solid vitreous substance. This substance is dissolved in 25 cm³ dimethylformamide and treated with 2.2 g (6.5 mmol) of N α -*t*-butoxycarbonyl-D-valine p-nitrophenyl ester. The mixture is left to stand at room temperature for four days, then evaporated to dryness under negative pressure. The residue is dissolved in 10 cm³ methanol and the product is precipitated by addition of 50 cm³ anhydrous ether. The solid product is purified by silica gel chromatography with a toluene-methanol (70:30) mixture; 1.1 g; $[\alpha]_D^{23}$ -53.5° (c 1.0, methanol).

N α -*t*-butoxycarbonyl-D-valine p-nitrophenyl ester is prepared from 5 g (24 mmol) N α -*t*-butoxycarbonyl-D-valine, 4.8 g (24 mmol), dicyclohexylcarbodiimide, and 3.4 g (24 mmol) p-nitrophenol dissolved in 25 cm³ dimethylformamide and the solution is left to stand at room temperature overnight. The solids are separated by filtration and the filtrate is evaporated to dryness under negative pressure. The residual oil is purified by silica gel chromatography in a methanol-benzene (5:95) mixture; 5 g; $[\alpha]_D^{23}$ +21° (c 1.0, methanol), ultraviolet in methanol λ_{\max} 270 E₁¹ 204.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

b) N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminy-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

N α -benzyloxycarbonyl- L-glutaminy-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl hydrazide (see Example 2, e); 1.3 g (1.7 mmol) is dissolved in dimethylformamide, 10 cm³, and the solution is cooled to -20°C. Hydrochloric acid is added in tetrahydrofuran, 4 cm³ (10 mmol) of 2.5N solution and then 0.2 g (1.8 mmol) of isopentyl nitrite. The mixture is agitated between -10 and -15°C for one hour, after which the temperature is lowered to -60°C. Triethylamine (1.2 g, 11 mol) is then added, followed by D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide (prepared by treating hydrochloride corresponding to N α -t-butoxycarbonyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide, 1.1 g, with 4N hydrochloric acid in 10 cm³ dioxane for one hour and precipitation of the hydrochloride with ether. The hydrochloride is rinsed with ether and utilized without further purification) in 5 cm³ dimethylformamide. The mixture is left to stand at 0°C for nineteen hours. It is then filtered and the solids are rinsed with 10 cm³ dimethylformamide. Evaporation of the filtrates under negative pressure gives the crude product in the form of a brown gum. The gum is dissolved in 5 cm³ methanol and the solution is poured dropwise into 500 cm³ of a 1:1 ethyl acetate-ether mixture under agitation. The solid substance is collected by filtration and rinsed with ether. Precipitation is repeated a total of three times. Thin-layer chromatography on silica with a 60:30:10 chloroform-methanol-acetic acid (32%) mixture shows that the product is accompanied by two major impurities. The product is further purified by chromatography on a silica gel column with a 70:30:5 chloroform-methanol-acetic acid (32%) mixture. Repeated chromatography is necessary to separate the product; $[\alpha]_D^{23}$ -38.6° (c 1.01, methanol); analyzed for 1.5 HCl.3.5H₂O; ultraviolet in methanol λ_{\max} 289 E₁¹ 46.8; λ_{\max} 280 E₁¹ 59.8.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example 9

N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

a) N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester

L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucine methyl ester, 1.53 g (Example 5, h) is dissolved in 35 cm³ of "spectrograde" dimethylformamide and the solution is cooled in an ice bath. N γ -benzyloxycarbonyl-N α -benzyl-L-glutamine, 777 mg, 1-hydroxybenztriazole, 311 mg, and dicyclohexylcarbodiimide, 475 mg, are added; left to stand for twenty hours at room temperature overnight and for twenty hours at room temperature. The mixture is filtered and the filtrate evaporated under negative pressure and the residue is shaken with 600 cm³ ethyl acetate and 0.1N hydrochloric acid. The solid substance is separated by filtration, washed with water, and dried in air under negative pressure; 1.68 g; $[\alpha]_D^{23}$ -14° (c 1.035, DMF); ultraviolet in methanol γ_{\max} 289.5 E₁¹ 51.4; γ_{\max} 280 E₁¹ 67.¹

N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutamine has been prepared by Gibian and Klieger, Ann., 640, 145 (1961).

b) N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl hydrazide

Methyl ester (a), 2.3 g, is dissolved in 35 cm³ dimethylformamide and treated with 2.0 cm³ hydrazine hydrate. The mixture is left to stand at room temperature for three hours, diluted with 35 cm³ absolute methanol, and left to stand at room temperature for twenty hours. The solution is evaporated to eliminate the methanol, the residual

¹ Sic. γ_{\max} (here and below) should presumably be λ_{\max} . Translator.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dimethylformamide solution is treated with 35 cm³ isopropanol and left to stand at room temperature for five hours. The precipitate is separated by filtration, ground with ether, separated by filtration, and dried under negative pressure; 1.78 g in the form of a monohydrate; melting point 245-249°C; $[\alpha]_D^{23}$ -14.9° (c 1.035, DMF); ultraviolet in methanol γ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 50.5; γ_{\max}^{280} E₁⁻¹ 66.0.

c) N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide

N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl hydrazide, 1.64 g (1.63 mmol) is dissolved in 40 cm³ of "spectrograde" dimethylformamide and the solution is cooled to -20°C. Six equivalents of hydrochloric acid, 3.65 cm³ of 2.45 N solution in dihydrofuran, followed by 0.3 cm³ of isopentyl nitrite are added. The mixture is agitated at -20°C for thirty minutes, cooled to -25°C, treated with 1.25 cm³ triethylamine, then with 500 mg L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride. The mixture is agitated between -20 and -15°C for 45 minutes in an ice-salt bath for three hours and stored overnight at 0 to 5°C. The reaction mixture is filtered and the filtrate is evaporated under negative pressure. The residue is ground in 150 cm³ tetrahydrofuran and the solvent is decanted. The solid substance is dissolved in 20 cm³ methanol and the solution is poured dropwise into 200 cm³ ethyl acetate. The mixture is cooled overnight, the solid is separated by filtration and dried under negative pressure; 1.81 g. The product is further purified by suspending in 200 cm³ water and agitating with 200 cm³ ethyl acetate. The mixture is filtered and the solid substance is dissolved into 250 cm³ warm methanol. The solution is decolorized with charcoal and evaporated to give a white solid which is dried under negative pressure; 1.1 g of N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide hydrochloride, analysis for 1 HCl.2.5H₂O; $[\alpha]_D^{23}$ -22.8° (c 1.02, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 40.3; λ_{\max}^{280} E₁⁻¹ 52.6.

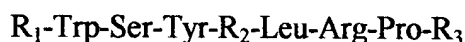
THIS PAGE BLANK (USPTO)

The hydrochloride (above), 800 mg, is treated with 15 cm³ of 1N acetic acid, 10 cm³ of 4N acetic acid, and 35 cm³ of methanol. Dowex 1 x 2 ion exchange resin is added in the acetate form, the mixture is shaken, and filtered through a sintered glass funnel. The filtrate is evaporated to eliminate the methanol and the residue is frozen and freeze-dried; 650 mg of N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-proline N-ethylamide acetic acid salt, analysis for 1 CH₃COOH.3 H₂O [α]_D²³ -30° (c 1.015, DMF); ultraviolet in methanol λ_{\max} 289.5 E₁⁻¹ 39.4; λ_{\max} 280 E₁⁻¹ 51.6; negative test for ionic chlorine.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

1. Octapeptide represented by the formula



and the corresponding salts where R_1 is Z-Gln, Z-Gln (Bzl), Bhoc-Gln, Boc-His (bzl), Z-His (bzl), Boc-Ser (bzl), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bzl), Z-Ile, Boc-Cys (bzl), Z-Phe or Z-Ser (bzl), R_2 is D-Phe, D-Ala, D-Leu, D-Trp, D-Tyr, D-Tyr (Me), D-Ser, D-Met, D-Arg, D-Val, D-His, D-Gln, D-Phe, D-Thr, D-Pro, or D-Asn, and R_3 is NH_2 , NH (lower alkoyl), N(lower alkoyl)_2 , NH-benzyl, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N (lower alkoyl)}_2$ or $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH-benzyl}$.

2. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-alanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide and its salts.

3. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide and its salts.

4. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl-N-ethylamide and its salts.

5. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from $\text{N}\alpha$ -benzyloxycarbonyl-*L*-glutaminyl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-tryptophyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-prolyl N-ethylamide and its salts.

6. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from $\text{N}\alpha$ -*t*-benzyloxycarbonyl-O-benzyl-*L*-seryl-*L*-tryptophyl-*L*-seryl-*L*-tyrosyl-*D*-phenylalanyl-*L*-leucyl-*L*-arginyl-*L*-proline N-ethylamide and its salts.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

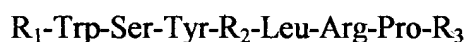
7. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from N α -benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-seryl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide and its salts.

8. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-threophenylseryl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide and its salts.

9. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from N α -benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-valyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline N-ethylamide and its salts.

10. Compound according to Claim 1, characterized by being chosen from N α -benzyloxycarbonyl-N γ -benzyl-L-glutaminyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-phenylalanyl-L-leucyl-L-arginyl-L-proline-N-ethylamide and its salts.

11. As a drug, octapeptide represented by the formula



and its salts, where R₁ is Z-Gln, Z-Gln (Bzl), Bhoc-Gln, Boc-His (bzl), Z-His (bzl), Boc-Ser (bzl), Boc-Pro, Z-Leu, Boc-Leu, Z-Tyr (bzl), Z-Ile, Boc-Cys (bzl), Z-Phe or Z-Ser (bzl), R₂ is D-Phe, D-Ala, D-Leu, D-Trp, D-Tyr, D-Tyr (Me), D-Ser, D-Met, D-Arg, D-Val, D-His, D-Gln, D-Phe, D-Thr, D-Pro, or D-Asn, and R₃ is NH₂, NH (lower alkoyl), N(lower alkoyl)₂, NH-benzyl, NHCH₂CH₂N (lower alkoyl)₂ or NHCH₂CH₂SO₂NH-benzyl.

12. Pharmaceutical composition containing a compound according to one of Claims 1 to 10 as the active ingredient.

THIS PAGE BLANK (USPTO)